PRINCIPII DE GENETICA MEDICALA
Cuprins

Capitolul 1 - Genetica umană şi importanţa ei în medicina modernă
Mircea Covic

Capitolul 2 - Structura şi organizarea celulară a ADN
Mircea Covic, Ionel Sandovici, Trandafir Angheloni

Capitolul 3 - Structura, analiza şi localizarea genelor
Mircea Covic, Dragoş Ştefănescu

Capitolul 4 - Expresia informaţiei ereditare (funcţia genei)
Mircea Covic, Ionel Sandovici

Capitolul 5 - Transmiterea informaţiei ereditare
Mircea Covic, Marius Bembea, Victor Pop, Mihai Voloşciuc

Capitolul 6 Variabilitatea genetică
Mircea Covic, Iuliana Dimofte, Julieta Puiu, Ionel Sandovici

Capitolul 7 - Genetica populaţiilor
Julieta Puiu, Emilia Severin, Mircea Covic

Capitolul 8 - Rolul factorilor genetici în producerea bolilor
Mircea Covic, Ortansa Stoica, Ionel Sandovici, Vlad Gorduza

Capitolul 9 - Consultul şi sfatul genetic
Mircea Covic, Marius Bembea, Ionel Sandovici, Dragoş Ştefănescu

Capitolul 10 - Bolile cromosomice
Mircea Covic, Iuliana Dimofte, Vlad Gorduza

Capitolul 11 - Bolile
Ionel Sandovici, Paula Grigorescu-Sido, Victor Pop, Dragoş Ştefănescu

Capitolul 12 - Bolile Mitocondriale
Dragoş Ştefănescu

Capitolul 13 - Bolile multifactoriale
Marius Bembea, Adrian Covic, Mircea Covic

Capitolul 14. Genetica dezvoltării şi anomaliile congenitale
Ionel Sandovici, Mircea Covic, Dragoş Ştefănescu, Andra Hurjui

Capitolul 15 Retardul mental
Mircea Covic, Cristina Rusu

Capitolul 16 Genetica sistemului imun
Petre Cianga, Mircea Covic

Capitolul 17Genetica bolii canceroase
Ionel Sandovici, Dragoş Ştefănescu, Mircea Covic

Capitolul 18. Profilaxia bolilor genetice
Dragoş Ştefănescu, Mircea Covic

Capitolul 19. Tratamentul bolilor genetice
Ortansa Stoica, Ionel Sandovici, Mircea Covic, Georgiana Tauşer

capitolul 20. Probleme şi dileme etice în genetica medicală
Vasile Astărăstoae, Cristina Gavrilovici, Ortansa Stoica, Mircea Covic

Prof. dr. Mircea Covic
Catedra de Genetică umană
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr.T.Popa” Iaşi
Prof.dr. Dragoş Ştefănescu
Institul medico-legal „Mina Minovici” Bucureşti
dr. Ionel Sandovici
Catedra de Genetică umană
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr.T.Popa” Iaşi

Biolog Trandafir Angheloni

Prof.dr. Vasile Astărăstoae

Conf.dr. Marius Bembea

Dr. Elena Braha

Şef lucrări dr. Petre Cianga

Conf.dr. Adrian Covic

Prof.dr. Iuliana Dimofte

Dr. Cristina Gavrilovici

Şef lucrări dr. Vlad Gorduza

Prof.dr Paula Grigorscu-Sido

Dr. Andra Hurjui

Conf. dr. Victor Pop

Conf. dr. Julieta Puiu

Şef lucrări dr. Cristina Rusu

Prof. dr. Emilia Severin

Conf dr. Ortansa Stoica

Şef lucrări dr. Mihai Voloşciuc

Dr. Georgiana Tauşer

CAPITOLUL 1

GENETICA UMANĂ ŞI IMPORTANŢA EI ÎN MEDICINA MODERNĂ

A. CONŢINUTUL GENETICII UMANE.

1. GENETICA – ŞTIINŢA EREDITĂŢII ŞI VARIABILITĂŢII

1.1. EREDITATEA

Ereditatea este proprietatea unui individ de *a transmite la urmaşi* caracterele sale personale precum şi cele ale speciei căreia îi aparţine. Acest proces realizează *similitudinea biologică* dintre părinţi şi descendenţi.

Părinţii nu transmit însă la copii caractere ci *informaţiile* (conţinute în genele din gameţi) necesare pentru realizarea caracterelor. În acest context, *ereditatea este un proces informaţional* care presupune stocarea, expresia şi transmiterea informaţiei ereditare, pentru realizarea caracterelor ale unui individ. *Ereditatea este deci o funcţie,* esenţială pentru viaţă.

a). **Acidul deoxiribonucleic (ADN)** este *substratul molecular al eredităţii*. Această macromoleculă, alcătuită din două catene polinucleotidice dispuse spaţial sub forma unei duble spirale helicoidale ("elicea vieţii"), îndeplineşte trei roluri majore (figura 1.1):

- *ADN deţine informaţia genetică codificată* pentru realizarea caracterelor specifice unui organism. Unitatea fundamentală de informaţie ereditară este **gena** - *un segment de ADN care determină un anumit caracter*. Modificarea structurii unei gene normale, numită **mutaţie**, produce o variantă genică (*"alelă"*), normală sau anormală.
- *ADN exprimă informaţia ereditară,* prin sinteza unor proteine specifice, care vor forma caracterele morfologice şi funcţionale ale organismului ("o genă → o proteină → un caracter") (figura 1.1.a).
- *ADN conservă informaţia ereditară* în succesiunea generaţiilor de celule şi organisme. Procesul se realizează prin *biosinteza* a două molecule noi şi identice de ADN prin *replicare semiconservativă*, urmată de *distribuţia* lor egală şi totală, prin *diviziune celulară* (figura 1.1.b). Replicarea şi diviziunea se efectuează cu mare precizie, asigurând fidelitatea de transmitere a informaţiei; ele pot suferi totuşi *erori*, care generează mutaţii.

b). **Aparatul genetic al celulei** cuprinde structurile celulare ce conţin ADN, *nucleul şi mitocondriile*. Elementul principal al aparatului genetic este nucleul, centrul de comandă şi control al majorităţii activităţilor celulare.

În **nucleul interfazic**, fiecare moleculă de ADN se asociază specific cu anumite proteine (histone) şi formează, prin spiralizări şi plieri succesive, **o fibră de cromatină**. La începutul diviziunii fibra de cromatină se condensează şi formează un *cromosom.*

Cromosomii reprezintă *substratul morfologic al eredităţii*; ei sunt organite *permanente* ale nucleului dar vizibile numai în diviziune. *Numărul şi forma cromosomilor sunt elemente caracteristice fiecărei specii*. La om, în celulele somatice sunt *46 de cromosomi* (2n = număr diploid); în celulele sexuale mature (gameţi) numărul de cromosomi este redus, prin meioză, la *23 de cromosomi* (n = număr haploid). Termenul de *genom uman* este folosit, în prezent, pentru a descrie *totalitatea* informaţiei genetice din celulele umane. El este alcătuit dintr-un

genom nuclear şi un *genom mitocondrial.* Pentru a face distincţia dintre genomul celulelor somatice şi al gameţilor se mai folosesc termenii de *genom diploid* şi *genom haploid.*

Mitocondriile conţin o mică parte din ADN celular (0.5%).

1.2. VARIABILITATEA

Variabilitatea reprezintă fenomenele care produc *diferenţele genetice* dintre indivizii unei populaţii, precum şi între populaţii diferite.

Sursele principale de variabilitate sunt *mutaţiile, recombinările genetice* (care au loc în meioză, în timpul formării gameţilor) şi *migraţiile* unor indivizi dintr-o populaţie în altă populaţie (după încrucişarea lor se produc modificări în structura genetică a descendenţilor). Datorită proceselor de variabilitate *fiecare individ are o structură genetica unică şi caracteristică..*

2. GENETICA UMANĂ - DISCIPLINĂ FUNDAMENTALĂ, CLINICĂ ŞI MEDICO-SOCIALĂ.

Genetica umană studiază ereditatea şi variabilitatea fiinţelor umane. Ea este o ştiinţă fundamentală şi aplicativă, care are un *rol major* în teoria şi practica medicală.

a). **Genetica umană este o disciplină fundamentală** deoarece studiază *structurile, mecanismele şi legile* de bază ale stocării, transmiterii şi expresiei informaţiei ereditare pentru formarea, dezvoltarea şi funcţionarea organismului uman. Genetica umană are un rol important pentru *baza conceptuală a medicinii* deoarece oferă o nouă perspectivă medicinii moderne, dominată de biologia moleculară a celulei, genetică şi imunologie.

b). **Genetica umană este şi o disciplină clinică** deoarece studiază relaţia dintre ereditate şi boală sau, mai exact, *rolul mutaţiilor în producerea bolilor sau predispoziţiei la boală.* Se cunosc peste 10.000 de *boli determinate sau condiţionate genetic,* care *afectează 5-8% din nou-născuţi*; ele au o mare *diversitate* şi se regăsesc în aproape toate specialităţile medicale. **Genetica medicală** - ca parte a geneticii umane - este însă *o specialitate clinică distinctă* care se ocupă de diagnosticul şi îngrijirea *pacienţilor* cu boli genetice precum şi de *familiile* lor, prin sfat genetic, diagnostic prenatal, screening neonatal sau diagnostic presimptomatic. Genetica este domeniul de activitate al unor specialişti dar fiecare medic practician trebuie să folosească o **abordare (gândire) genetică** în relaţia sa cu pacientul şi familia acestuia.

c). **Genetica umană / medicală este şi o disciplină medico-socială** deoarece bolile genetice au devenit, în ultimii 20 de ani, *"probleme majore de sănătate publică"*[1] Ele sunt numeroase, în ansamblul lor frecvente (peste 5% nou născuţi) şi au deseori *consecinţe grave pentru individul afectat şi familia sa*. Datorită caracterului lor *cronic* şi *invalidant*, bolile genetice influenţează negativ morbiditatea şi mortalitatea infantilă şi necesită *cheltuieli medicale importante*; de aceea, bolile genetice sunt *o povară importantă pentru societate;* În aceste condiţii eforturile specialiştilor şi organizatorilor de sănătate publică trebuie să se finalizeze printr-un *sistem naţional de prevenire şi depistare precoce a bolilor genetice.*

B. OMUL, EREDITATEA ŞI MEDIUL.

1. INDIVIDUALITATEA GENETICĂ ŞI BIOLOGICĂ.

1.1. INDIVIDUALITATEA GENETICĂ.

[1] Pentru ca o boală sau un grup de boli să fie o "problemă de sănătate publică" trebuie să îndeplinească trei condiţii: să aibe o frecvenţă mare, să necesite cheltuieli importante pentru îngrijirea bolnavilor şi să poată fi prevenită eficace, prin programe speciale.

Fiecare fiinţă umană se formează dintr-o celulă iniţială, **zigotul**, rezultat prin fecundarea gameţilor haploizi: nucleul spermatozoidului se uneşte cu cel al ovulului şi formează nucleul zigotului, prima celulă a unei noi fiinţe. La zigot *se reface astfel numărul diploid de 46 de cromosomi,* caracteristic speciei umane, şi se *stabileşte sexul genetic: XX sau XY*. De fapt, se formează 23 perchi de **cromosomi omologi**, *identici* ca mărime, formă şi conţinut genetic dar *diferiţi ca origine*, unul matern şi altul patern. Rezultă că fiecare caracter este determinat *de o pereche de gene*, ce ocupă aceiaşi poziţie (*locus*) în cromosomii omologi; ele se numesc **gene alele**.

Zigotul reuneşte în nucleu genele parentale din gameţi într-o *combinaţie nouă, unică şi constantă* denumită **individualitate genetică** *sau* **genotip**. Citoplasma zigotului este *exclusiv* de origine maternă. Deci, mitocondriile din zigot, care conţin ADN, şi ulterior mitocondriile tuturor celulelor somatice *provin de la mamă*.

Cromosomii zigotului conţin în genele lor *informaţia ereditară* necesară pentru formarea caracterelor noului organism, precum şi pentru **programul genetic** al dezvoltării sale viitoare: fiecare individ parcurge în cursul existenţei sale biologice mai multe *etape succesive, obligatorii, diferite calitativ şi precis definite în timp*, ce constituie **dezvoltare ontogenetică.**

1.2. INDIVIDUALITATEA BIOLOGICĂ.

Genetica modernă a demonstrat că **fiecare om este unic** atât prin structura sa genetică cât şi prin mediul în care s-a dezvoltat în timp.

Mediul cuprinde totalitatea factorilor ecologici (naturali) şi mai ales psihologici şi socio-culturali, care acţionează asupra omului, într-o anumită perioadă a dezvoltării sale ontogenetice. El determină unele caractere ale organismului şi influenţează realizarea caracterelor condiţionate primar de *ereditate*.

Cele două "forţe" care participă la formarea caracterelor noastre se condiţionează reciproc. *Ereditatea determină un potenţial* pentru formarea unor caractere, care se finalizează variat, în funcţie de condiţiile specifice de mediu socio-economic şi cultural în care se dezvoltă o anumită persoană. Rezultă deci că *unicitatea omului este bio-psiho-socială..*

Ansamblul unic de caractere specifice, produse prin interacţiunea permanentă, dar în proporţii diferite, dintre ereditate (genotip) şi mediu se numeşte **individualitate biologică** sau **fenotip**.

1.3. IMPORTANŢA CONCEPTULUI DE INDIVIDUALITATE GENETICĂ ŞI BIOLOGICĂ.

Analiza rolului eredităţii şi mediului în determinismul caracterelor umane ne-a permis să precizăm două idei foarte importante: *unicitatea bio-psiho-socială* a fiecărei fiinţe şi *interacţiunea permanentă, dar în proporţii variate, a eredităţii şi mediului* (între "înnăscut şi dobîndit") în geneza caracterelor umane, normale şi patologice. Aceste idei de bază ale conceptului de individualitate biologică au influenţe importante în gândirea şi practica medicală. Dar conceptul în sine are aplicaţii şi în alte sectoare ale activitaţii umane: culturale, politice şi sociale.

In medicină, individualitatea biologică a fiecărei persoane explică:

- *diferenţele de răspuns* ale fiecărui organism la agresiunile mediului şi, deci, *vulnerabilitatea diferită* a oamenilor la îmbolnăvire;
- *determinismul bolilor comune*, prin interacţiunea dintre structura genetică a unui individ (ce determină o anumită predispoziţie la boală) şi factorii agresivi din mediu;
- *manifestările variabile şi gravitatea* diferită ale aceleiaşi boli la pacienţi diferiţi;
- *răspunsul diferit,* particular, la *acelaşi tratament* aplicat unor bolnavi diferiţi, suferind de

aceeaşi boală[2]. *"Nu există tratamente general valabile pentru o boală ci terapii adaptate la bolnavi"*, în funcţie de capacitatea lor de metabolizare a unui medicament.

Aforismul mai vechi **"nu există boli ci numai bolnavi"** capătă astfel o explicaţie corectă, eminamente genetică, şi determină acţiuni precise şi *individualizate* în diagnosticul şi tratamentul bolnavilor şi, mai ales, în profilaxia bolilor. În acest ultim domeniu, se ajunge la o *prevenţie personalizată şi la o* **medicină predictivă**: în funcţie de expresia unor elemente ale structurii genetice individuale, moştenită de la părinţi, se va putea stabili *ce riscuri de îmbolnăvire are o anumită persoană*. Toate aceste elemente au influenţe importante şi în planul eticii medicale.

In viaţa socială*, diversitatea genetică şi socio-culturală a indivizilor* este o premiză valoroasă de integrare, armonizare şi progres social. *Oamenii sunt diferiţi* şi aceasta le permite să aibă *fiecare* un rol social util şi să se completeze armonios în societate. Diferiţi nu înseamnă însă şi inegali. *"Egalitatea este un concept moral care a fost inventat tocmai pentru că fiinţele umane nu sunt identice"* (F.Jacob). Genele nu sunt egale sau inegale ci pur şi simplu diferite, determinînd calităţi şi aptitudini diferite. Diversitatea este cel mai valoros capital al speciei umane.

Mediul socio-cultural şi educaţional adecvat este deosebit de important în realizarea potenţialului genetic individual (vezi *Caseta 1.1.*). *"Spiritul şi cultura îi permit omului să nu fie total dependent de moştenirea sa ereditară, dobîndindu-şi adevărata libertate de fiinţă bio-psiho-socială"* (Wilson). În acest context exagerarea rolului factorilor genetici, de către aşa numita **socio-biologie**, considerându-se că structura genetică cu care s-a născut un individ va determina (ca un destin implacabil) tot ce va face el în cursul vieţii, precum şi fundamentarea inegalităţilor sociale pe baza aşa-zisei inegalităţi genetice a oamenilor sunt idei absurde şi periculoase.

CASETA 1.1.

Individualitatea bio-psiho-socială.

Fiecare fiinţă umană este unică datorită structurii sale genetice şi mediului în care a trăit. Factorii de mediu socio-economici şi psiho-culturali au o pondere importantă în formarea individualităţii noastre bio-psiho-sociale. Ea determină cel puţin două consecinţe majore în viaţa socială.

- *Metodele educaţionale în familie şi şcoală trebuie reevaluate. Mediul familial în care cresc copiii trebuie să fie în primul rând cultural. Pentru dezvoltarea lor intelectuală părinţii trebuie să le ofere copiilor cultură. S-a constatat că în condiţii relativ identice de mediu social, diferenţele de inteligenţă (Q.I.) dintre copii se corelează semnificativ cu ocupaţia părinţilor şi gradul de cultură al familiei. Devine evident că nivelul cultural scăzut al unor părinţi sau declinarea obligaţiilor educaţionale pe seama şcolii, au efecte negative asupra dezvoltării copilor. In şcoală, învăţământul ar trebui diferenţiat în funcţie de posibilităţile, calităţile şi aptitudinile elevilor. Uniformizarea metodelor educaţionale - generează inegalităţi individuale.*
- *Capacităţile şi aptitudinile individuale trebuie folosite adecvat, după formula "omul potrivit la locul potrivit", deoarece fiecare om poate fi valoros într-un anumit domeniu. Aceasta presupune selecţia, formarea şi promovarea valorilor, înţelegînd prin "valori" orice calităţi deosebite, utile societăţii. "Curajul de a recepţiona valoarea şi de a sprijini direct afirmarea ei este o demonstraţie de mare şi adevărat patriotism" (M. Maliţa).*

2. DETERMINISMUL CARACTERELOR FENOTIPICE.

Caracterele fenotipice normale sau anormale ale organismului sunt produse prin

[2] Recent s-a demonstrat că diferiţi bolnavi cu hipertensiune arterială esenţială răspund diferit la medicamentele de bază folosite în această afecţiune: beta-blocanţi, inhibitori ACE şi blocanţi de canale de calciu. Necesitatea unei *terapii individualizate* devine astfel evidentă.

acţiunea eredităţii (genotipului) şi mediului. În funcţie de ponderea celor doi factori cauzali se pot deosebi teoretic trei categorii de caractere (figura 1.2): caractere pur ereditare; caractere determinate de interacţiunea ereditate - mediu; caractere pur ecologice (neereditare).

2.1. CARACTERE FENOTIPICE PUR EREDITARE.

Caracterele pur ereditare sunt *determinate exclusiv de structura genetică*, normală sau modificată, a unui individ, deci de către genotip. Caracterele pur ereditare sunt de trei feluri: caractere de specie, caractere ereditare normale, caractere anormale / boli genetice.

a). **Caracterele de specie** sunt *strict genetice*: fiecare specie are o anumită structură genetică, ordonată într-un *set fix şi caracteristic de cromosomi*, cu o anumită morfologie. Această configuraţie specifică realizează o "barieră" reproductivă între specii.

b)**. Caracterele ereditare normale** sunt determinate *monogenic* şi *transmise mendelian*. Ele sunt reprezentate de diferite *sisteme grupale*: grupele sanguine (ABO, Rh, MN, etc.), serice (haptoglobine, transferine, ş.a.), enzimatice (fosfatază acidă,etc.) şi tisulare (antigenele HLA).

Marea majoritate a acestor sisteme sunt *polimorfice*, găsindu-se în populaţie în mai multe variante (de ex.., grupele A, B, AB şi O pentru sistemul ABO); un individ posedă însă numai *o anumită variantă* dintr-un sistem. Datorită numărului mare de sisteme polimorfice (>30) si de variante în fiecare sistem, *un individ posedă o combinaţie specifică de variante, este* **un unicat biologic!!!**

Acest lucru poate fi demonstrat parţial şi indirect în felul următor: să presupunem că o persoană X prezintă variantele cele mai comune în populaţie pentru 30 de caractere [O, Rh+, MN, Se, Le, ... pentru grupele sanguine; Gm-1, Hp 2.1, C3 ... pentru proteinele serice; PA-c, AK-11, PGM 1 pentru enzime; HLA: A1 A3, B7 B8... pentru grupele tisulare]. Probabilitatea de a întâlni o altă persoană identică, cu aceeaşi configuraţie de variante, este egală cu produsul frecvenţelor populaţionale ale fiecărui caracter; rezultatul este edificator 1 : 700.000.000.

Studiul caracterelor ereditare normale are *importanţă teoretică* pentru localizarea (cartografierea) genelor pe cromosomi şi explicarea unor fenomene genetice (inclusiv a transmiterii mendeliene) dar, mai ales, o *valoare practică* deosebită în: identificarea persoanelor, expertiza paternităţii şi filiaţiei, transfuzii şi transplante, diagnosticul diferenţial al gemenilor monozigoţi (MZ) şi dizigoţi (DZ), identificarea persoanelor vulnerabile la diferite îmbolnăviri,

c). **Caracterele ereditare anormale** sunt prezente *numai la unii indivizi.* Ele sunt produse de *mutaţii* şi reprezentate de bolile cromosomice, bolile monogenice şi bolile mitocondriale.

- **Bolile cromosomice** sunt produse de *adiţia (trisomie) sau pierderea (monosomie) unui cromosom întreg sau a unei părţi din cromosom*; de ex., sindromul Down (trisomia 21) sau sindromul Turner (monosomia X).
- **Bolile monogenice** sunt produse de *mutaţia unei gene (din genomul nuclear) cu efect major*, care determină boala prin anomalii ale unor proteine de structură (hemoglobină, colagen, factori de coagulare, etc.) sau enzime (erori înnăscute de metabolism etc.). Aceste mutaţii se *trasnmit* în succesiunea generaţiilor după tipul mendelian[3]: autosomal dominant (de ex., *hipercolesterolemie familială*), autosomal recesiv (de ex. *fibroza chistică*) sau legat de X (de ex. *hemofilia*). Cu toate că sunt "pur" genetice, manifestarea unora din aceste boli poate fi influenţată *pozitiv prin intervenţie medicală*, deci de anumite condiţii de mediu.

  De exemplu: **Fenilcetonuria** (PCU) este o boală ereditară (OMIM # 261600) care evoluiază spre retard mintal sever; ea poate fi prevenită prin depistarea la naştere a bolnavilor şi folosirea unui regim dietetic fără fenilalanină; ambele acţiuni medicale influenţează manifestarea acestei boli genetice şi purtătorii mutaţiei pot fi normali, în anumite condiţii de mediu.

[3] Despre transmiterea monogenică, mendeliană, a caracterelor normale şi bolilor monogenice vom discuta mai târziu, în capitolul 5. Aici vom preciza doar că există un catalog al tuturor bolilor monogenice (OMIM –On line Mendelian Inheritance of Man) în care fiecare afecţiune este de înregistrată print-un număr de cod.

- **Bolile mitocondriale** sunt un tip particular de boli monogenice produse de mutaţii în *genomul mitocondrial*, care afectează producerea de energie în muşchi şi nervi; ele au un rol important în îmbătrânirea celulară. Bolile mitocondriale se moştenesc într-un mod particular: *de la mamă la toţi copii, dar băieţii afectaţi nu transmit boala*.

2.2. CARACTERE DETERMINATE DE INTERACŢIUNEA EREDITATE - MEDIU

Numeroase caractere fenotipice, normale sau anormale, sunt produse de *interacţiunea, în proporţii diferite, dintre ereditate şi mediu* (figura 1.2). De aceea aceste caractere sunt numite **caractere multifactoriale**.

a). **Caracterele multifactoriale normale** sunt determinate de *interacţiunea* variabilă dintre ereditate şi mediu; ex.: talia, greutatea, tensiunea arterială, inteligenţa, etc. În realizarea acestor caractere multifactoriale *ereditatea determină o parte din caracter*, mai mare sau mai mică (denumită **heritabilitate**), precum şi *limita superioară* sau **potenţialul genetic** până la care poate fi dezvoltat acel caracter, în cele mai favorabile condiţii de mediu (figura 1.3). Mediul produce *o altă parte* din caracter şi determină sau nu *atingerea* limitei superioare sau *realizarea potenţialului genetic* individual.

De exemplu: talia - este condiţionată genetic în proporţie de 67% . Fiecare individ are o *"limită superioară"* determinată genetic, până la care poate creşte şi pe care *nu o poate depăşi*. Ea este o caracteristică *familială*, fiind determinată de talia părinţilor şi condiţiile în care creşte copilul. Atingerea acstei limite depinde de mediul de viaţă al individului. Aşa se explică faptul ca gemenii monozigoţi (care au o ereditate identică), crescuţi în medii diferite vor avea înălţimi diferite, iar populaţii genetic diferite ce trăiesc în acelaşi mediu vor avea talii diferite.

Ereditatea nu determină deci un caracter unic ci *un şir de capacităţi fenotipice* numit **"normă de reactie"** a individului la mediu sau potenţial genetic. De aceea, Aristotel avea dreptate spunînd că *"… natura omului nu este cea cu care s-a născut ci aceea pe care el o poate dezvolta"*. Potenţialul nostru genetic ne permite să ne *adaptăm* la cele mai variate condiţii de mediu, dar, firește, nu putem depăşi anumite limite. În condiţii obişnuite nici nu există un asemenea risc; *există însă pericolul de a folosi incomplet, subliminal, potenţialul genetic al organismului.*

b). **Caractere multifactoriale anormale** sunt reprezentate de *anomaliile congenitale* izolate (de ex., malformaţiile congenitale de cord, spina bifida, despicăturile labio-maxilo-palatine etc) şi de numeroase *boli comune ale adultului* (hipertensiunea arterială esenţială, boala coronariană, diabetul zaharat, ulcerul gastric / duodenal, unele cancere, etc.)

In producerea acestor boli factorii ereditari (reprezentaţi de obicei prin mai multe gene) şi factorii de mediu *interacţionează* permanent şi complex. Deaceea, aceste afecţiuni au un determinism etiologic (cauzal) complex şi se numesc **boli multifactoriale** (≥ 5% din populaţie). Ele pot avea o *distribuţie familială* dar NU se transmit mendelian (!). De cele mai multe ori, factorii genetici realizează o **predispoziţie genetică**, o *vulnerabilitate* individuală la îmbolnăvire. Bineînţeles, nu toţi indivizii predispuşi se îmbolnăvesc deoarece este necesară şi intervenţia factorilor de mediu care transformă predispoziţia în boală (figura 1.4). Boala apare deci prin *interacţiunea* obligatorie dintre ereditate şi mediu (PG+M=B).

Astfel, persoanele cu *grupa sanguină O şi nesecretori* (deoarece nu elimină antigenele de grup sanguin prin secreţii) fac mai frecvent *ulcer duodenal*, dar sunt mai rezistenţi la infecţiile virale. Indivizii "*negustători*" (care nu simt gustul amar al unor substanţe) se îmbolnăvesc mai des de guşă nodulară decât cei "gustători", dacă consumă substanţe naturale antitiroidiene (care au gust amar). Indivizii cu *Hp2-2* au un risc crescut de boală coronariană. Riscul relativ al persoanelor care posedă antigenul *HLA B27* de a face boli reumatismale cronice este de 120 ori mai mare decât cei care nu au acest antigen.

Identificarea *factorilor* care determină predispoziţia genetică la îmbolnăvire, precum şi a *persoanelor* genetic predispuse, reprezintă modalităţi importante pentru **profilaxia** bolilor comune ale adultului, prin *descoperirea şi evitarea factorilor de mediu care transformă predispoziţia în boală*. Deoarece *genele ce determină boala sau predispoziţia la boală se transmit în familie,* se poate spune că *"nu există boli ci …familii de bolnavi"*. Acest fapt este

deosebit de important în practica medicală întrucât *extinde obligatoriu atribuţiile medicului* de la bolnav la familia lui.

c) Bolile prin mutaţii somatice sunt produse prin efectul cumulativ al unor *mutaţii somatice succesive, în gene diferite*, unele determinate de factori de mediu, altele prin erori de replicare a ADN. Ex. marea majoritate a cancerelor, multe boli autoimune şi procesul de îmbătrânire. Aceste boli se produc *după concepţie*, sunt *limitate la celulele somatice* şi deci *NU se transmit la descendenţi*; într-un procent mic de cazuri o mutaţie iniţială (importantă dar nu suficientă pentru producerea bolii) se poate moşteni de la unul din părinţi, producând o predispoziţie genetică la boală (ex., mutaţia genei BRCA1 în cancerul de sân familial).

2.3. CARACTERE FENOTIPICE DETERMINATE DE MEDIU.

a). Caractere "ecologice". *Mediul extern* este reprezentat de diferiţi agenţi fizici, chimici sau biologici care pot produce deseori îmbolnăviri: arsuri, traumatisme, boli de iradiere, intoxicaţii, infecţii. Aceste boli sunt *aparent negenetice*.

Dar, foarte probabil exceptând accidentele, *efectele agresiunilor exogene asupra organismului sunt influenţate de structura genetică, specifică fiecărei persoane*. Genotipul individual determină *o eficienţă diferită* a mecanismelor de apărare imună sau de metabolizare a unor substanţe, deci *un mod specific de răspuns la agresiuni,* influenţând apariţia, manifestarea şi gravitatea îmbolnăvirilor. Datorită acestei *influenţe genetice* se consideră că aproape nu există caractere "pur" ecologice.

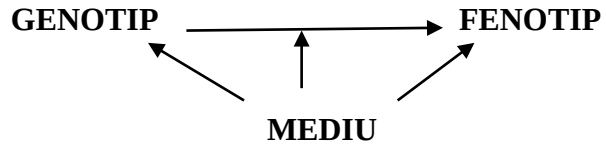
> Astfel, în *infecţii* s-a constatat, din cele mai vechi timpuri, că în diferite epidemii nu se îmbolnăvesc *toţi* cei care vin în contact cu microorganismele patogene şi că gravitatea bolii *variază* de la un individ la altul. Astăzi se ştie că vulnerabilitatea sau rezistenţa la infecţii este determinată de constituţia genetică a fiecărei persoane şi, în special, de structura proprie de antigene HLA, *"sistemul de supraveghere, alarmă şi apărare imunologică a organismului"* (vezi cap.8). Unele combinaţii (de ex.: A1 - B8 - DR3) produc un răspuns umoral puternic şi cei care le posedă sunt mai bine protejaţi de acţiunea microorganismelor patogene, dar pot face boli autoimune; alte combinaţii (de ex.: A3 - B7 - DR2) dau un răspuns mult mai slab. Ce genială previziune a avut Claude Bernard afirmînd, la sfârşitul secolului 19: *"microbul nu-i nimic, terenul este totul"*.

b). Ecogenetică şi farmacogenetică. Studiul *variaţiilor individuale determinate genetic* la acţiunea factorilor externi se realizează astăzi de o ramură a geneticii umane numită **ecogenetică**. De ex. *alergenii* induc astm la perosanele susceptibile (atopie); *laptele* sau *alcoolul* nu sunt tolerate de persoanele cu deficienţe în lactază şi, respectiv, alcooldehidrogenază..

- Ecogenetica include şi **farmacogenetica** care studiază *diferenţele genetice individuale* în răspunsul organismelor la acţiunea medicamentelor. Această problemă va fi discutată pe larg în capitolul 8, aici vom aminti un singur exemplu: *deficienţa în glucoză-6-fosfat dehidrogenază (G6PD)* a globulului roşu (boală recesivă legată de X)(OMIM # 305900). Persoanele cu această deficienţă nu prezintă obişnuit nici o manifestare clinică; după expunerea la anumite medicamente (antimalarice, furazolidon etc), substanţe chimice (naftalen), consumul alimentar de bob (*Vicia Fava)* sau infecţii; ele dezvoltă o anemia hemolitică acută.
- Numeroase observaţii au demonstrat că *"nu există tratamente general valabile pentru o boală ci terapii adaptate la bolnavi"*, în funcţie de capacitatea lor de metabolizare a unui medicament.

3. RELATIA GENOTIP → FENOTIP ← MEDIU.

Interacţiunea dintre ereditate şi mediu se poate exprima sintetic prin relaţia:



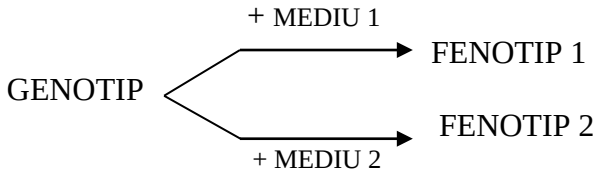
Reamintim că prin *genotip* se înţelege structura genetică unică şi caracteristică unui individ, care se stabileşte în momentul fecundării şi rămâne *stabilă* în cursul dezvoltării. Prin termenul de *fenotip* se defineşte totalitatea caracterelor manifeste şi specifice ale unui organism determinate de interacţiunea genotipului cu mediul în care trăieşte acel organism. Dependent de ereditate şi mediu *fenotipul este variabil*, se poate schimba.

3.1. RELAŢIA GENOTIP → FENOTIP.

Relaţia genotip → fenotip[4] este o relaţie *cauzală*, dar *nu este totală* deoarece unele gene (*recesive*) nu se manifestă fenotipic, iar o parte din caracterele fenotipice sunt produse de mediu. Caracterele fenotipice determinate de genotip sunt *caractere pur erditare* (ex.: grupele sanguine, serice, enzimatice, tisulare).

Relaţia genotip → fenotip este însă mult mai *complexă*. Fără a intra în detalii (pe care le vom discuta ulterior) vom menţiona succint trei fenomene: heterogenitatea genetică, o genă-mai multe boli şi norma de reacţie.

- **Heterogenitatea genetică** *este fenomenul prin care genotipuri diferite se pot manifesta fenotipic identic*. De ex: mutaţii în genele pentru factorii VIII şi IX ai coagulării, gene situate în loci diferiţi pe cromosomul X, se manifestă clinic asemănător, prin hemoragii importante la traumatisme minime (datorită perturbării coagulării); aceste două mutaţii diferite produc **hemofiliile** A si B. Conceptul de heterogenitate genetică are o deosebită *importanţă practică* pentru realizarea unui diagnostic etiologic (cauzal) precis al unor boli diferite cu manifestare identică; pe această bază se va putea face un tratament eficace (adecvat cauzei) şi se va realiza o evaluare corectă a riscului de recurenţă, prin sfatul genetic.
- **O genă, mai multe boli**. Mutaţii diferite în aceiaşi genă pot produce boli diferite. De ex., mutaţii variate în gena β-globinei produc *drepanocitoză, β-talasemie, methemoglobinemie*. Un alt exemplu: mutaţii diferite în gena *RET* produc o formă familială de cancer medular a tiroidei (izolată sau asociată sindroamelor MEN2A şi MEN2B; MEN - de la *Multiple Endocrine Neoplasia*) precum şi megacolonul congenital (boala Hirschprung)
- **Norma de reacţie** (potenţialul genetic) se caracterizează prin faptul că un genotip nu determină întotdeauna un *anumit fenotip*; datorită interacţiunii cu alte gene şi cu mediul, un acelaşi genotip poate determina fenotipuri diferite sau, mai exact, variaţii de manifestare ale aceluiaşi caracter . De aceea se consideră că genotipul determină un potenţial fenotipic sau o normă de reacţie la mediu. *"Genotipul este 'partitura', iar fenotipul este 'simfonia' pe care noi o auzim, marcată de personalitatea şefului de orchestră, minunată sau fără strălucire, după calităţile executanţilor"* (A.Jaquard).



Potenţialul genetic realizat diferit în funcţie de mediu explică *"variaţiile în expresia unor gene"*, de tipul penetranţă, expresivitate etc. (vezi cap. 5).

3.2. RELAŢIA MEDIU → FENOTIP.

Relaţia mediu → fenotip este o *relaţie cauzală*, dar caracterele fenotipice produse de mediu (numite şi "modificaţii") sunt *neereditare*. Ele sunt cel mai adesea caractere anormale sau boli produse de agenţi fizici, chimici sau biologici: arsuri, traumatisme, intoxicaţii, avitaminoze şi mai ales infecţii. Dar, aşa cum am mai precizat, exceptând accidentele, efectele agresiunilor mediului asupra organismului sunt influenţate de structura sa genetică specifică.

[4] Relaţia genotip → fenotip se poate aplica şi în sens restrâns: "o gena → un caracter".

Uneori caracterele fenotipice produse de mediu *se manifestă identic* sau foarte asemănator cu caracterele fenotipice produse de genotip. De ex., *microcefalia*[5] poate fi produsă de o infecţie fetală sau de o mutaţie genică. Diferenţierea cauzală în aceste cazuri, cunoscute sub numele de **fenocopii**, este foarte importantă în evaluarea riscului de recurenţă la sarcinile următoare: în primul caz (microcefalia produsă de factorii de mediu) riscul de recurenţă este practic nul dacă se evita o nouă agresiune; în al doilea caz, riscul este mare şi depinde de tipul mutaţiei.

3.3. RELAŢIA MEDIU → GENOTIP

Mediul poate acţiona direct asupra genotipului producând modificări ale materialului genetic sau **mutaţii.** Ele pot afecta structura genei sau a cromosomilor şi pot avea consecinţe variate: unele modificări generează fenotipuri mutante anormale, altele determină variantele polimorfice populaţionale pe care le prezintă un caracter.

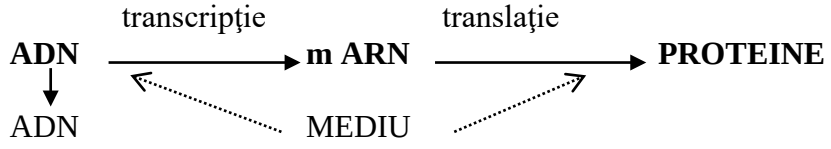
3.4. RELAŢIA GENOTIP→FENOTIP←MEDIU LA NIVEL MOLECULAR.

Relaţia dintre genotip şi fenotip îşi dezvăluie întreaga sa semnificaţie atunci când este analizată la nivel molecular. Termenul de genotip poate fi substituit prin însăşi substratul material al genelor: molecula de ADN. Caracterele fenotipice sunt determinate de proteine structurale (colagen, oseină, elastină, hemoglobină, ş.a) sau enzime.În acest fel relaţia genotip → fenotip devine: ADN → PROTEINE şi se traduce prin ideea fundamentală că ADN deţine şi exprimă informaţia necesară pentru sinteza proteinelor, ce constituie suportul biochimic al caracterelor ereditare ale organismului.

Relaţia ADN → PROTEINE se poate nuanţa şi completa dacă ţinem cont de următoarele elemente:

- expresia informaţiei ereditare *nu se face direct*; ea este copiată prin procesul de *transcripţie* într-o moleculă de ARNm, care trece în citoplasmă , unde are loc sinteza proteinei (*translaţie*);
- informaţia genetică din molecula de ADN se poate transmite (conserva) în succesiunea generaţiilor, prin *replicare semiconservativă*, formîndu-se molecule de ADN identice;
- fiecare element şi etapă a relaţiei poate fi *influenţată de mediu*.

Pe baza acestor date, relaţia ADN → PROTEINE poate fi "reformulată". Obţinem astfel o nouă relaţie, denumită frecvent **dogma centrală sau fundamentală a geneticii**.



4. OMUL - SUBIECT DE STUDIU AL GENETICII UMANE

a). **Dezavantaje.** În comparaţie cu alte organisme, fiinţa umană pare, la prima vedere, un "material" de studiu genetic care prezintă suficiente *inconveniente*: diversitatea genetică a indivizilor, mare şi necontrolată; dificultatea studiilor genealogice; numărul mic al subiecţilor observaţi; dispersia geografică etc; în plus, nu se pot face experienţe genetice pe om.

b). **Avantaje.** În realitate omul a devenit rapid un *subiect important* pentru cercetările genetice deoarece este *fiinţa cea mai bine studiată*. Sunt disponibile pentru cercetări populaţii mari, în care se pot analiza numeroase şi variate tipuri de mutaţii, veritabile "experimente" ale naturii. Prin folosirea unor metode adecvate, inclusiv a unor tehnici noi de culturi celulare şi analiză moleculară, pot fi depăşite dificultăţile inerente ale studiilor familiale. Se poate

[5]Reducerea perimetrului cranian sub -2 DS (deviaţii standard) însoţită de retard mintal

conchide fără rezerve ca omul reprezintă un subiect deosebit de interesant pentru studiile genetice.

C. ISTORIA GENETICII UMANE

Relaţia dintre genetică şi medicină trebuie analizată dintr-o *perspectivă istorică*, urmărind modul în care *evoluţia geneticii a interferat şi influenţat în timp evoluţia medicinii*, ajungând la stadiul actual de "medicină moleculară". Interacţiunea dintre medicină şi genetică a fost permanentă, bidirecţională şi foarte productivă, mai ales în ultimele decenii. Vom prezenta în mod succint şi schematic principalele etape şi evenimente din evoluţia geneticii umane.

3. ETAPA PREŞTIINŢIFICĂ (→ 1865).

În această etapă s-au realizat numeroase observaţii corecte privind *agregarea familială şi transmiterea ereditară a unor boli* (hemofilie, polidactilie, albinism)*;* numeroase interpretări erau însă eronate. Se caracterizează prin lipsa cunoştinţelor privind procesele de bază (concepţie, reproducere etc), *eludarea analizei* şi absenţa unei *teorii generale,* convingătoare, care să explice fenomenele ereditare.

2. ETAPA FUNDAMENTĂRII GENETICII CA STIINŢĂ ŞI INTRODUCERII SALE ÎN MEDICINĂ (1865→ 1960) .

Fundamentarea geneticii ca ştiinţă a fost făcută de către **Gregor Mendel** (1865), care introduce **conceptul genei** şi formulează **legile eredităţii**. La începutul secolului XX, prin contribuţia mai multor cercetători dar mai ales a lui **T.H.Morgan** (primul premiu Nobel pentru genetică) se formulează **teoria cromosomică a eredităţii**. Apar primele studii de *genetică în medicină*: **F. Galton** (1890) analizează unele caractere umane complexe, "cantitative" (talia, inteligenţa), introduce conceptul interacţiunii dintre ereditate şi mediu, iniţiază studiul gemenilor şi dermatoglifelor; **A. Garrod** (1902) introduce mendelismul în medicină prin studiul primelor *"erori înnăscute de metabolism"* (alcaptonuria, albinismul, cistinuria şi pentozuria) precum şi ideea *"individualităţii biochimice",* prin care explică răspunsurile diferite la droguri şi infecţii ale unor persoane diferite.

În deceniile cinci şi şase începe *era geneticii moleculare,* prin demonstrarea rolului genetic al ADN (Avery et al. 1944) şi descoperirea modelului structurii ADN (Watson şi Crick, 1953).

Apariţia **geneticii medicale** a fost determinată de două descoperiri remarcabile: L. Pauling (1949) demonstrează că o boală ereditară, anemia hemolitică cu hematii în seceră (sicklemia sau drepanocitoza) este produsă de o hemoglobină anormală (Hb S), care se deosebeşte de Hb A prin înlocuirea unui singur aminoacid; sicklemia devine *prima boală moleculară* identificată la om; J. Lejeune (1959) descoperă *prima anomalie cromosomică* la om, trisomia 21, în sindromul Down.

3. DEZVOLTAREA GENETICII MEDICALE (1960→ 1970).

În această scurtă perioadă (*"deceniul de aur"*) se acumulează numeroase dovezi privind *rolul important al factorilor genetici în producerea bolilor umane*. Concomitent cu reducerea marcată a frecvenţei bolilor infecţioase şi nutriţionale, a devenit evident că bolile genetice sau condiţionate genetic reprezintă, cel puţin în ţările dezvoltate, *o cauză majoră de morbiditate şi mortalitate, o problemă de sănătate publică*.

S-au amplificat *aplicaţiile practice ale geneticii medicale*, care capătă o *pondere tot mai importantă în practica medicală*; dintre acestea menţionăm: perfecţionarea *diagnosticului*

bolilor metabolice şi a *depistării sistematice la nou născuţi* a unor boli frecvente şi tratabile (fenilcetonuria, hipotiroidia congenitală); ameliorarea tehnicilor de *analiză cromosomică*, prin metode noi de marcaj în benzi, care permit identificarea precisă a unor anomalii structurale minime; dezvoltarea *sfatului genetic* (evaluarea riscului de apariţie a unor boli genetice în familii); introducerea şi amplificarea *diagnosticului prenatal*; optimizarea *tratamentului simptomatic şi patogenic* în diferite boli genetice, care încetează să mai fie "fără speranţe terapeutice".

4. NOUA GENETICĂ UMANĂ ŞI MEDICINĂ MOLECULARĂ (1980 →)

a). Revoluţia metodologică a geneticii moleculare

Până în anul 1970 genele erau entităţi virtuale, inaccesibile analizei biochimice. La începutul deceniului opt se descoperă tehnici performante de *analiză directă a ADN, a genei*. Ele au permis: identificarea şi localizarea unor gene; izolarea şi clonarea lor; descifrarea "mesajului" genelor (prin secvenţializarea ADN) şi, eventual, expresia lor în diferite celule "gazdă", în care se obţin proteinele codificate de genă. Aceste tehnici de "manipulare genetică" sau **"ADN recombinant"** reprezintă o veritabilă *"inginerie genetică"*.

Genetica iese din cadrul său abstract şi începe *o nouă eră a genetiii moleculare*. Ea produce *o veritabilă revoluţie în biologie*, deoarece deschide calea înţelegerii marilor enigme: originea vieţii, evoluţia, speciaţia, diferenţierea celulară şi morfogeneza, senescenţa, organizarea şi funcţionarea sistemului nervos şi imun, cancerul etc. Iniţial noile metodologii ale geneticii moleculare au fost receptate de către lumea ştiinţifică cu justificată teamă, atribuindu-li-se pericolul unor consecinţe nefaste şi necontrolabile. Rezervele s-au dovedit ulterior puţin justificate şi, treptat, "ingineria genetică", simplificându-şi procedurile iniţiale şi crescându-şi gradul de accesibilitate, a "invadat" toate sectoarele biologiei şi în special medicina.

Deşi au trecut doar 15-20 ani de la introducerea noilor tehnologii de studiu direct al genei, aceste descoperiri, recompensate cu numeroase premii Nobel, au generat *consecinţe majore pentru genetica umană dar mai ales pentru teoria şi practica medicală* (tabelul 1.1)

b). Noua genetică umană şi medicina moleculară.

Cu ajutorul tehnicilor de analiză moleculară a *început descifrarea şi cartografierea genomului uman*. Până în prezent au fost identificate şi localizate pe cromosomii umani peste 10000 de gene normale şi mutante. S-au studiat efectele unor gene "importante" în fiziologia şi patologia umană: genele pentru imunoglobuline, interferoni, factori de creştere, receptori hormonali, lipoproteine, colagen, oncogene, etc.

În anul 1980 s-a iniţiat **"Proiectul genom uman",** unul din cele mai ample şi ambiţioase programe de cercetare medicală; în februarie 2001 s-a finalizat schita secvenţei întregului genom uman şi se estimează că până în anul 2005 toate cele circa 30.000-40.000 de gene fi identificate şi analizate.

Anatomia şi fiziologia, normală şi patologică a genomului uman determină o abordare moleculară a tuturor problemelor de genetică medicală; deoarece ea este atât de diferită de abordările anterioare a fost numită *"noua genetică umană"*.

Restructurându-şi elementele sale fundamentale, prin introducerea *anatomiei şi fiziologiei genomice,* medicina anilor '90 devine o *medicină moleculară*. Eforturile şi realizările cele mai mari s-au făcut în domeniul *elucidării mecanismelor moleculare de producere a bolilor*. Afecţiunile genetice au fost, firește, primul beneficiar al aplicării noilor tehnici de analiză moleculară. În ultimii ani se constată însă o extensie a câmpului de acţiune al analizei patogeniei moleculare la *bolile comune*: cancerul, boala coronariană, diabetul zaharat, hipertensiunea arterială, etc încercându-se descoperirea genelor implicate în predispoziţia la boală. Pe baza cunoaşterii mecanismelor moleculare s-au introdus noi metode de diagnostic şi tratament, care se adresează *moleculelor implicate în procesele patologice*. În acest context, rolul geneticii medicale devine din ce în ce mai important.

Tabelul 1.1 Lista laureaţilor Premiilor Nobel pentru descoperiri în domeniul geneticii

ANUL	LAUREAŢI	DESCOPERIRE
1933	Thomas Hunt Morgan	
1946	H J Muller	
1958	G W Beadle, E L Tatum, J Lederberg	
1959	S Ochoa, A Kornberg	
1962	Francis Crick, James Watson, Maurice Wilkins	Structura moleculară a ADN
1965	Francois Jacob, Jacques Monod, Andre Kwoff	Reglarea genetică
1968	Robert Holley, Gobind Khorana, Marshall Nirenberg	Descifrarea codului genetic
1975	Renato Dulbecco, Howard Temin, David Baltimore	Interacţiunea dintre virusurile tumorale şi ADN nuclear
1978	William Arber, Daniel Nathans, Hamilton Smith	Endonucleazele de restricţie
1980	Baruj Bernacerraf, George Snell, Jean Dausset	Controlul genetic al răspunsului imun
1980 (chimie)	F Sanger, Paul Berg, W Gilbert	
1983	Barbara McClintock	Genele mobile (transposonii)
1985	Michael Brown, Joseph Goldstein	Receptorii celulari în hipercolesterolemia familială
1987	Tonegawa Susumu	Aspectele genetice ale anticorpilor
1989	Michael Bishop, Harold Varmus	Studiul oncogenelor
1993	Richard Roberts, Philip Sharp	Structura discontinuă a genelor
1993 Chimie	K B Mullis, M Smith	
1995	Edward Lewis, Christiane Nusslein-Volhard, Eric Wieschaus	Genele homeotice si alte gene implicate în dezvoltare

D. IMPORTANŢA GENETICII ÎN MEDICINA MODERNĂ

1. BOLILE GENETICE

Bolile genetice erau considerate raritǎţi cu care practicianul se întâlnea întâmplător în cursul activităţii sale. Pe măsură ce tehnologiile de studiu şi cunoştinţele de genetică au progresat iar frecvenţa bolilor negenetice (cauzate de malnutriţie, infecţii, ş.a.) a diminuat spectaculos, a devenit evident impactul masiv al patologiei genetice în practica medicinii moderne.

Bolile genetice sunt numeroase; se cunosc peste *10.000 de boli determinate sau condiţionate genetic*; ele au o mare diversitate, se manifestă la orice vârstă, orice sistem de organe şi deaceea se regăsesc în aproape toate specialităţile medicale. **Bolile gentice sunt frecvente;** ele *afectează cel puţin 5-8% din nou-născuţi* (1 din 20) şi probabil 30– 40 % de indivizi în tot cursul vieţii (tabelul 1.2)

Tabelul 1.2 Incidenţa[6] bolilor genetice

(modificat după Connor & Ferguson-Smith, 1997 şi Jorde et al. 2000)

Tipuri majore de boli genetice	Număr de subtipuri	Incidenţa la 1000 nou-nascuţi vii
Boli cromosomice (ex.: sindrom Down)	> 600	6 - 9
Boli monogenice (mendeliene)		24
– Autosomal dominante (ex.: boala polichistică renală a adultului = ADPKD;	8544*	20
– Autosomal recesive (ex., fibroza chistică)		2
– Legate de X (ex.: hemofilia; daltonismul)	527*	2
Boli mitocondriale	60	Rare
Boli multifactoriale (debut înainte de 25 ani)		20 - 50
– Malformaţii congenitale majore (ex., spina bifida, DSV, despicăturile labio-maxilo-palatine)	>50	
– Boli comune ale adultului (ex.: hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, boala ulceroasă, schizofrenia)	>50	
Total (înainte de 25 ani)		**50 - 83**
Boli genetice ale celulelor somatice[#]	>100	250
Total		300 - 383

* După OMIM (1998).

[#] Acest tip de boli apar după naştere, la circa 25% adulţi.

Bolile genetice au o contribuţie majoră la mortalitatea infantilă şi morbiditate. Acum mai puţin de un secol bolile produse de cauze negenetice (malnutriţie, infecţii, condiţii insalubre etc) produceau majoritatea deceselor la copil; în sec. XX sănătatea publică s-a îmbunătăţit şi ca rezultat mortalitatea infantilă s-a redus iar *bolile genetice au devenit o cauză majoră a deceselor la copil*. De exemplu în Marea Britanie decesele prin boli genetice erau 16,5% în 1914 şi 50% în 1976. 30-50 % din internările în spitalele de copii sunt determinate de afecţiuni genetice sau anomalii congenitale; circa 10 % din internările în spitalele de adulţi sunt produse de boli genetice sau condiţionate genetic. Circa 50% din avorturile spontane din trim.I sunt produse de anomalii cromosomice. Aproximativ 2-3% din nou-născuţi au o anomalie congenitală majoră, deseori produsă de factori genetici; alţi 2% nou-născuţi au o anomalie cromosomică sau o boală monogenică.

Bolile genetice sunt boli cronice care realizează frecvent un **handicap** fizic, senzorial, motor sau mintal. Bolile genetice produc peste 50% din cazurile severe de retard mintal, de surditate sau cecitate la copil. Ingrijirea pacienţilor cu boli genetice implică **cheltuieli importante.**

Se poate conchide, fără rezerve, că **bolile genetice reprezintă o problemă majoră de sănătate publică**, ce impune acţiuni concrete şi eficace de diagnostic şi un **Program naţional de profilaxie a bolilor genetice**, bazat pe sfat genetic, screening şi diagnostic prenatal, screening neonatal (pentru boli frecvente şi tratabile), registre regionale sau naţionale şi diagnosticul presimptomatic în familiile cu risc genetic crescut.

2. GENETICA MEDICALĂ

Genetica medicală - ca parte a geneticii umane – a devenit *o specialitate clinică distinctă* care se ocupă de diagnosticul şi îngrijirea *pacienţilor* cu boli genetice precum şi de

[6] *Incidenţa* se referă la *rata* cu care se produc cazuri noi. *Prevalenţă* se referă la proporţia unui grup afectat la un anumit moment (în cazul bolilor genetice prevalenţa este mai mică decât incidenţa fie din cauza speranţei de viaţă mai reduse, fie din cauza debutului bolii la vârste mai tardive. *Frecvenţa* este un termen nespecific, folosit uneori sinonim pentru incidenţă

familiile lor prin: *sfat genetic, diagnostic prenatal, screening neonatal sau diagnostic presimptomatic*. *Ponderea acestor servicii de genetică* în asistenţa medicală a populaţiei este importantă şi nu poate fi ignorată. În fiecare an se nasc în România circa 7200 copii cu anomalii congenitale iar 12.000 vor fi afectaţi de diferite boli genetice înainte de 25 de ani. Deci circa 20.000 de copii şi familiile lor (în care şi alte persoane au un risc genetic) au nevoie anual de diagnostic, explorări şi sfat genetic; aceasta impune cu necesitate crearea unei reţele naţionale de Centre de Genetică Medicală regionale şi Cabinete judeţene.

Numeroasele descoperiri din ultimul deceniu au avut efecte importante asupra *teoriei şi practicii medicale.* Vom enumera cele mai importante consecinţe.

- *Diagnosticul genotipic*. În plan diagnostic, perfecţionarea metodelor de analiză moleculară, la nivel genic, a permis ameliorarea capacităţii de identificare a unor boli, indiferent de vârsta pacientului (făt, nou născut, copil, adult) şi deseori înainte de manifestarea clinică a bolii (presimptomatic). Diagnosticul genotipic devine astfel o nouă şi eficace acţiune în medicina practică. Deasemeni, cu ajutorul unor sonde specifice, se pot detecta genomurile unor virusuri, bacterii şi paraziţi care infectează organismul uman.
- *Farmacologia genomică şi terapia genică*. Pe plan terapeutic tehnicile de ADN recombinant au dus la obţinerea unor noi mijloace şi soluţii terapeutice. A început *fabricarea industrială a unor proteine umane cu valoare terapeutică* (insulină, interferon, hormon de creştere, eritropoietină, factor VIII, streptokinază, ş.a.) prin inserţia unor gene umane în bacterii şi cultivarea lor în bioreactoare. A *apărut farmacologia "genomică"* în care prin sinteza unor inhibitori ai transcripţiei genelor mutante sau a unor oligonucleotide anti-sens (complementare ADN sau mARN) se încearcă blocarea funcţionării genelor mutante sau a genomurilor exogene a unor virusuri (de ex., HIV). A devenit operaţională (din 1991) şi *terapia genică*, în care prin fabricarea şi introducerea unor gene normale în celulele somatice ale unor bolnavi cu afecţiuni genetice grave se poate ameliora / corija efectul genelor mutante.
- *Profilaxia personalizată şi medicina predictivă.* Profilaxia bolilor capătă, graţie geneticii, o nouă dimensiune. Adresându-se familiilor sau persoanelor cu risc genetic, profilaxia devine *individualizată, personalizată*. Identificarea unor gene ce determină susceptibilitatea unor persoane sănătoase la anumite boli (de ex., la anumite forme de cancer) precum şi studiul unor markeri genetici individuali asociaţi cu vulnerabilitatea la boală (de ex., la hipertensiune arterială, boală coronariană, ş.a.) deschid calea unei *medicini predictive,* bazată pe "previziunile" prenatale sau premorbide. Medicina predictivă, cu toate dilemele etice pe care le suscită, oferă mari speranţe pentru prevenirea bolilor.

3. MEDICINA ÎN ERA POST- GENOMICĂ

Descifrarea completă a secvenţei genomului uman va avea implicaţii certe asupra practicii medicale, determinând progrese majore în diagnosticul, tratamentul şi prevenirea multor boli. Desigur, nu trebuie să exagerăm rolul geneticii medicale şi nici nu trebuie să uităm riscul potenţial al discriminării gentice sau numeroasele implicaţii etice, legale şi sociale pe care le vor avea noile descoperiri ale geneticii.

Secvenţierea genomului uman este doar sfârşitul unei etape şi începutul *erei postgenomice* în care se vor multiplica eforturile de a identifica genele asociate cu variate caracatere biologice, inclusiv boli, şi se vor identifica variantele alelice ale genelor şi profilurilor de expresie în diferite ţesuturi normale sau anormale. O atenţie specială se va acorda interacţiunilor complexe dintre gene precum şi între gene şi mediu. Mulţi geneticieni, şi nu numai ei, cred că toate acestea vor fundamenta noua eră a *medicinii moleculare*.

Optimiştii cred că studiul bolilor bazat pe mecanismele lor moleculare şi biochimice va schimba orientarea practicii medicale de la diagnostic şi tratament la predicţie şi profilaxie, bazate pe gene de susceptibilitate. Dar şi elemntele tradiţionale se vor modifica deoarece

nimeni nu se îndoieşte că diagnosticul genotipic (deseori presimptomatic sau prenatal) va fi tot mai mult aplicat iar farmacogenomica va permite un tratament bazat pe genotipul individual, va descoperi noi „ţinte" pentru medicamente şi va „rafina" specificitatea lor de acţiune.

Pesimiştii consideră că secvenţierea genomului nu este decât unul dintre paşii numeroşi pe care medicina îi are de făcut pentru a înţelege mai bine procesele patologice. Genele acţionează într-o reţea de interacţiuni complexe, cu alte gene şi cu mediul, astfel că orice corelaţie dintre genotip şi fenotipul clinic (mai ales în bolile comune) va fi dificilă. Testele genetice predictive vor avea o eficienţă mică asupra morbidităţii şi mortalităţii, deoarece o proporţie redusă din populaţie este afectată de boli monogenice iar rata mutaţiilor noi este destul de importantă. Testele de susceptibilitate identifică numai o predispoziţie la boală nu şi riscul efectiv de boală (determinat de parametri mai complexi). În plus, persoanele cu risc (de exemplu pentru cancer) au încă opţiuni terapeutice reduse. Terapia genică rămâne o posibilitate a unui viitor nu prea apropiat. Implicaţiile etice, sociale şi legale pot fi importante în absenţa unei politici clare de protecţie a confidenţialităţii informaţiei genetice.

Echilibrul necesar dintre punctele mai extreme de abordare a efectelor secvenţierii genomului uman asupra practicii medicale pleacă de la recunoaşterea faptului că am intrat în era postgenomică, decisivă pentru disecţia mecanismelor moleculare ale bolilor. Aplicaţiile clinice vor depinde de abordarea etică şi socială a problemelor dar cu certitudine vor oferi soluţii de reducere a consecinţelor atât a bolilor genetice cât şi acelor comune, multifactoriale. Nimeni nu poate ignora că medicina a devenit moleculară şi că genetica va contribui decisiv la dezvoltarea şi eficienţa ei.

CASETA 1.2

Va revoluţiona genetica MEDICINA?

Acesta este titlul unui articol publicat de către Holtzman şi Marteau în anul 2002 în prestigioasa revistă New England Journal of Medicine, care a generat numeroase dezbateri şi opinii divergente. În analiza lor, autorii pornesc de la un punct de vedere amplu exprimat şi sintetizat de Francis Collins, directorul Institutului naţional de cercetare a genomului uman, din SUA: „...(noua genetică) va permite o înţelegere nouă a contribuţiei geneticii la bolile umane şi dezvoltarea unor strategii raţionale de reducere sau prevenire a tuturor bolilor", cu referire specială la bolile comune ale adultului.

Autorii recunosc că secvenţializarea genomului uman va schimba profund diagnosticul şi tratamentul bolilor monogenice, mendeleene, dar acestea numai o mică parte din populaţie, comparativ cu bolile comune ale adultului care au o certă predispoziţie genetică: diabetul zahart, boala coronariană, hipertensiunea arterială, astmul bronşic, psihozele, cancerele de sân şi colon etc. În ciuda unor cercetări intense, s-au descoperit puţine gene de susceptibilitate (cu penetranţă mare) şi acestea explică doar 3-5% din toate cazurile de boală iar efectul lor asupra riscului de îmbolnăvire este relativ redus, cresc riscul doar de 2-3 ori. Dificultăţile sunt explicabile prin faptul că riscul de boală depinde de interacţiunea mai multor gene şi a unor factori de mediu. În aceste condiţii, prevenţia prin testare în masă pentru identificarea persoanelor cu risc are o eficienţă redusă şi o finalitate limitată în absenţa unor tratament eficiente (de ex. în cancere). În opinia autorilor, complexitatea etiologiei bolilor comune lasă dubii dacă predicţia precisă pentru un număr mare de persoane din populaţie (deci nu din familiile cu risc crescut) va fi vreodată posibilă. În aceste condiţii contribuţia geneticii va fi mai mică şi nu este bine să pierdem din vedere alte posibilităţi de îmbunătăţire a sănătăţii publice.

Fără îndoială observaţiile autorilor sunt pertinente, în momentul actual, dar în condiţiile în care medicina a devenit moleculară şi progresele cunoaşterii sunt rapide, cu consecinţe greu de prevăzut în prezent, nu credem ca putem anula optimismul benefic pe care noua genetică îl aduce abordării bolilor comune; fără genetica moleculară patogenia lor va fi la fel de misterioasă iar intervenţiile profilactice şi terapeutice puţin eficace.

4. ABORDAREA GENETICĂ ÎN RELAŢIA MEDIC - PACIENT

Genetica devine nu numai o parte integrantă a medicinii moderne ci şi *o componentă de rutină* a îngrijirii bolnavilor şi familiilor lor. Se produce astfel o modificare importantă în *relaţia "medic-pacient"*.

Este important să reamintim că practica medicinei se bazează pe abordarea unui individ cu o *problemă* de sănătate. Confruntat cu pacientul bolnav medicul trebuie să adune datele necesare pentru a răspunde la două întrebări specifice: 1. Care este *problema?* (ce are bolnavul?) 2. Ce se poate face pentru *rezolvarea* acestei probleme? În esenţă, răspunsul la cele două întrebări înseamnă *diagnostic şi tratament,* elemente tradiţionale şi esenţiale pentru practica medicală. Totuşi, alte două întrebări adiţionale au devenit importante odată cu dezvoltarea geneticii: 3. De ce *această* persoană are *această* problemă (afecţiune) *acum*? 4. Există căi / mijloace pentru *a preveni sau reduce* o problemă viitoare (pentru această persoană sau familia sa)? Aceste două întrebări necesită cunoştinţe sporite de fiziopatologie şi genetică.

Aşa cum am arătat, abordarea/ gândirea genetică se bazează pe trei principii fundamentale: 1) *individualitatea (unicitatea) genetică a fiecărei persoane* (vezi B.1.3)*;* 2) *rolul important al factorilor genetici* în producerea bolilor sau a predispoziţiei la diferite îmbolnăviri; 3) *transmiterea genelor mutante* la alţi membri ai familiei, ceea ce face ca *familia să fie o unitate de interes şi acţiune*. Cele trei componente majore ale *abordării (gândirii) genetice* se pot rezuma în sintagme cunoscute:

- *"nu există boli ci numai bolnavi";*
- *"aproape orice boală are o componentă genetică";*
- *"nu există boli ci ... familii de bolnavi".*

Abordarea genetică presupune *informarea pacientului* asupra: a) modului său particular de a face boala şi răspunde la tratament; b) componentei genetice a bolii; c) caracterului ei familial. La această acţiune se adaugă *implicarea medicului în familia bolnavului,* pentru diagnosticul unor cazuri noi de boală sau identificarea unor persoane cu risc, care trebuie sfătuite şi ajutate corespunzător. Nu este vorba de fapt *"de a şti genetică medicală"* (specialitate clinică distinctă) ci de *a practica o bună medicină pe baze genetice.*

În esenţă, abordarea genetică în medicină, înţelegerea şi aplicarea în practică a celorlalte descoperiri ale geneticii şi medicinii moleculare presupune *o cultură şi ... o concepţie (gîndire) genetică*, care trebuie însuşite. Pentru medicul practician această acţiune pare dificilă dar toate lucrurile noi sunt dificile; abordarea lor merită făcută atunci când beneficiile sunt reale şi importante.

Volumul şi complexitatea informaţiilor genetice au crescut substanţial şi nu pot fi utilizate fără a recurge la sistemele informatice de stocare, regăsire şi utilizare datelor (programe informatice, CD-ROM "actualizate", Internet). (vezi *Caseta 1.2*.). Valoarea şi utilitatea practică a datelor genetice (în special în *individualizarea* tratamentului sau profilaxiei) nu mai pot fi ignorate şi *obligă pe clinicieni să folosească aceste informaţii pentru a-şi asista pacienţii*. Aceasta presupune nu numai cunoaşterea principiilor de bază ale geneticii medicale ci şi disponibilitate pentru un sistem de educaţie medicală continuă, care nu poate fi ignorat de nimeni.

Pentru studentul în medicină care nu are încă o perspectivă clară a medicinii şi practicii medicale, dar trebuie să memoreze numeroase lucruri, genetica prin caracterul ei raţional, logic şi aplicativ ar putea fi un moment bine venit. În plus există şi o puternică motivaţie: *genetica înarmează viitorul medic cu principiile necesare înţelegerii viitorului medicinei.*

CASETA 1.3.

Genetica umană pe Internet

INTERNETUL este un sistem internaţional amplu care leagă între ele computerele individuale şi reţele locale din universităţi, laboratoare de cercetări, organizaţii guvernamentale sau comerciale. World Wide Web (www) este o modalitate de folosire a internetului cu ajutorul unui program web browser. Web foloseşte documente hypertext sau http (de la hypertext transmission protocol), care arată ca un text obişnuit (ce poate fi citit, editat, stocat, etc.) dar unele cuvinte sau cadre (boxes) sunt subliniate printr-o culoare (albastră); acestea sunt legăturile (links) de acces la alte documente. Facând click pe o astfel de legătură se poate accesa un alt computer, la mii de kilometri distanţă.

Fiecare document web are un cod propriu numit uniform resource locator (URL) sub forma http://www numele serverului. De ex. URL pentru serverul www de la The National Center for Biotchnology Information este http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ iar URL pentru European Bioinformatics Institute este http://www.ebi.ac.uk/ După ce se scrie adresa, web browserul computerului deschide Home Page din care prin cadrele de legătură se pot accesa alte pagini web.

Adresele diferitor baze de date se pot schimba. Dacă una din adresele cunoscute nu funcţionează trebuie să o căutăm, plecînd de la un punct start, folosind "o maşină de căutare" de tipul Yahoo: http://www.yahoo.com; folosind acest sistem se pot căuta documente cu un subiect specific. De la acest punct de start se pot găsi legăturile către diferite baze de date.

Adresele cele mai folosite în genetica umană sunt:

- *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) este catalogul caracterelor monogenice umane normale şi patologice, creat de Victor McKusick, care este continuu actualizat. OMIM este legat de alte baze de date. Poate fi accesat: in USA: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim ; in UK: http://www.hgmp.mrc.ac.uk./omim/*
- *Genome Database: http://ww.gdb.org/*
- *Gene cards: http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/index/html Prezintă, într-o formă concisă, date integrate din multiple baze de date.*
- *Cytogenetic resources: http://www.kumc.edu/gec/geneinfo.html prezintă o legătură foarte utilă cu multiple site-uri, inclusiv: Cytogenetic Images Index, Gene Map of human chromosomes, Human Cytogenetics Database, Chromosome Databases, Karyotypes of normal and abnormal chromosomes.*
- *Medline: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/ Dă informaţii (rezumate) asupra articolelor publicate în revistele biomedicale; ele pot fi accesate pe autori, titluri, cuvinte cheie etc.*
- *The National Center for Biotchnology Information:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/*
- *The National Center for Genomic Resources: http://www.ncgr.org*
- *The National Human Genome Research Institute Home Page: http://www.nhgri.nih.gov*
- *European Bioinformatics Institute este http://www.ebi.ac.uk/*

Descrierea acestor site-uri şi altora, utile în documentarea şi activitatea celor interesaţi de domeniul geneticii medicale este prezentată la sfârşitul cărţii într-o anexă specială. La fiecare capitol se vor prezenta adresele site+urilor relevante pentru capitolul respectiv.

Bibliografie specifică selectivă[7]

1. Baird P.A., Anderson T.V., Newcombe H.B., Lowry R.R. *Genetic disorders in children and young adults: a population study*- Am.J.Hum.Genet 1988; 42:677-693

[7] Bibliografia specifica selectivă cuprinde o selecţie de articole recente privitoare la capitol si recomandate cititorilor pentru completarea informaţiilor. La sfârşitul cărţii există o bibliografie generală ce include tratate, monografii, cărţi de genetică umană şi medicală. Deasemeni , într-o anexă specială sunt date adresele unor site-uri de internet accesibile pentru completarea informaţiilor în aceste domenii.

2. Guttmacher A.E., Collins F.S. *Genomic medecine – a primer*. New E.J.Med 2002;347:1512-1520
3. Lawrence S., Giles CL - *Accessibilitty of information in the web* - Nature, 1999, 400, 107- Holtzman N.A., Marteau T.M. Will genetics revolutionize medicine? New E.J.Med 2000; 343:141-144
4. Maximilian C. - *Geneza individualităţii* – Ed. Sport-Turism, Bucureşti, 1980
5. McKusick V.A. *History of medical genetics.* in Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (3rd eds) - Emery and Rimoin's Principles and practice of medical genetics. Vol.1, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 1-30
6. McKusick V.A. *Medical genetics: a 40-year perspective on the evolution of a medical specialty from a basic science*. JAMA, 1993; 270:2351-2356
7. Peltonen l., McKusick V.A. *Genomics and medicine: Dissecting human disease in the postgenmics era*. Science 2001;291:1224-1229
8. Williams S.J, Hayward N.K. *The impact of the Human Genome Projct on medical genetics*. Trends Mol.Med. 2001;7:229-231
9. Wilson G.N. *The genomics of human dysmorphology.* Am.J.Med.Genet. 1992; 43:187-196
10. * * * BMJ nr. 7293, 2001 (număr dedicat geneticii): *Genetics-delivering the dreams?*

CAPITOLUL 2

STRUCTURA **ŞI ORGANIZAREA CELULARĂ A** ADN

ADN este molecula fundamentală a vieţii. Toate mecanismele prin care se realizează structura şi funcţiile celulelor, asamblate în ţesuturi şi organe, precum şi răspunsurile lor la acţiunea mediului intern sau extern - sunt codificate şi reglate de structura uimitor de simplă şi elegantă a genomului uman. De aceea, *înţelegerea structurii ADN şi a organizării sale în celule este fundamentală pentru studiul geneticii medicale şi medicinei* în general.

A. ADN ESTE SUBSTRATUL MOLECULAR AL EREDITĂŢII

1. EVOLUŢIA CONCEPŢIILOR DESPRE NATURA GENEI.

În anul 1865, MENDEL a formulat *ipoteza genei* potrivit căreia fiecare caracter este detreminat de "*o pereche de factori ereditari*" (numiţi mai târziu gene) şi a stabilit legile eredităţii. Astfel, el a pus bazele geneticii ca ştiinţă.

Iniţial, în ipoteza lui Mendel, gena era o entitate *abstractă,* ipotetică, şi natura sa chimică era necunoscută. Ulterior, la începutul secolului XX, demonstrându-se rolul cromosomilor în ereditate (Sutton, Boveri şi mai ales T.H.MORGAN), gena a devenit un element concret, material, *un segment dintr-un cromosom care determină un caracter specific*, dar natura ei chimică a rămas în continuare necunoscută.

La începutul deceniului patru s-a stabilit că în structura cromosomilor există proteine şi acizi nucleici: ADN şi ARN; *una din aceste componente trebuia să fie substratul chimic al genei.* Mulţi cercetători credeau atunci că genele sunt formate din proteine, cele mai complexe substanţe chimice din celule; ADN era considerat o moleculă prea simplă pentru înmagazinarea informaţiei ereditare şi transmiterea ei în succesiunea generaţiilor. Existau totuşi unele *argumente "indirecte"* care pledau pentru **rolul genetic al ADN**: localizarea aproape exclusivă a ADN în *nucleu şi cromosomi*, structuri cu rol important în ereditate; cantitatea sa *constantă şi caracteristică* speciei, proporţională cu numărul cromosomilor (celulele sexuale au jumătate din ADN-ul celulelor somatice); stabilitatea *metabolică* a moleculei de ADN. În 1944, Avery et al. au demonstrat experimental că ADN-ul este substratul molecular al eredităţii.

2. DEMONSTRAREA ROLULUI GENETIC AL ADN.

În 1928, microbiologul englez F. Griffith a făcut o observaţie remarcabilă. El a studiat morfologia şi patogenitatea diferitelor tulpini de *pneumococus*. Unele tulpini aveau o capsulă polizaharidică şi cultivate pe agar formau colonii "netede", fiind numite S (de la *"smooth"*) iar altele erau necapsulate şi formau colonii "rugoase", fiind numite R (de la *"rough"*). Griffith a observat că şoarecii injectaţi cu pneumococi S au murit iar cei injectaţi cu tulpina R au supravieţuit; deci pneumococii S erau *patogeni*, producând septicemie şi moarte. Patogenitatea,

deteminată de prezenţa capsulei, se transmite ereditar. În mod surprinzător, un amestec de pneumococi R (nepatogeni) vii şi pneumococi S (patogeni) inactivaţi prin căldură a avut un efect letal. De la animalele moarte s-au izolat pneumococi S *vii*. Explicaţia posibilă a acestui fenomen era *transformarea* tulpinilor de pneumococi R vii în tulpini S vii, sub influenţa unor componente din structura pneumococilor S omorâţi; natura chimică a substanţei care a produs transformarea nu a putut fi însă stabilită.

În 1944, Avery, Mac Leod, Mc Carty (de la Rockefeller Institut) au reluat experienţele lui Griffith şi au demonstrat experimental că *ADN-ul este factorul transformant*. Autorii au arătat că ***transferul ADN*** extras de la o tulpină de pneumococi S capsulaţi, patogeni, la pneumococi R necapsulaţi, nepatogeni, determină **transformarea** lor în pneumococi patogeni (R $\rightarrow$ S); mai exact, un segment de ADN-S ce conţine gena pentru capsulă a fost încorporat în ADN-ul pneumococilor R. Această modificare *nu era realizată de proteine* sau de alte componente din structura pneumococilor S şi era *inhibată de ADN-ază* (figura 2.1); odată produsă, modificarea *se transmite* la generaţiile următoare, fiind deci *ereditară*. Pe această bază s-a presupus că *ADN este materialul genetic.*

Aşa cum se întâmplă adesea cu marile adevăruri, rolul genetic al ADN, clar şi elegant demonstrat de Avery et al. a fost însă un timp negat. În 1952, Hershey şi Chase (Premiul Nobel, 1969) au demonstrat că *transferul exclusiv al ADN* de la bacteriofagi la Escherichia coli transformă această bacterie în celule producătoare de particule fagice, cu o structură completă, inclusiv capsula proteică (figura 2.2). Autorii au marcat proteinele capsulare ale bacteriofagilor cu sulf radioactiv (^{32}S) iar ADN cu fosfor radioactiv (^{35}P); când bacteria E. coli a fost infectată cu bacteriofagi "marcaţi", se observă că numai ^{35}P (deci ADN) pătrunde în celulă (^{32}S - proteinele capsulare rămân la exterior). Formarea ulterioară a unor particule fagice noi, complete, demonstrează clar că ADN era unicul purtător al informaţiei ereditare.

Demonstrarea faptului că *transferul ADN de la un microorganism la altul produce transformări permanente şi ereditare ale primitorului* a constituit dovada decisivă că genele sunt alcătuite din ADN.

Experienţele de transformare ereditară produse de ADN şi numeroase alte dovezi au stat la baza unei noi paradigme fundamentale în biologie şi au inaugurat *revoluţia moleculară în genetică*. Introducerea unor segmente de ADN în celule cultivate "in vitro" (transfecţie) sau în zigoţi / embrioni ("animale transgenice") stă la baza ingineriei genetice. Mai mult, ea reprezintă principiul de bază al terapiei genice, cea mai extraordinară realizare a medicinei ultimilor ani.

B. STRUCTURA ADN

Descoperirea rolului genetic al ADN[1] a concentrat atenţia cercetătorilor asupra structurii sale, întrucât descifrarea ei reprezenta singura cale *pentru înţelegerea naturii şi funcţiei genei*. În anul 1953, James Watson şi Francis Crick au propus un model al moleculei de ADN alcătuit din două catene polinucleotidice, legate complementar prin bazele azotate, înfăşurate într-o elice dublă, răsucită spre dreapta.

Modelul WATSON-CRICK al structurii ADN reprezintă, probabil, *cea mai mare descoperire a biologiei moderne* (Premiul NOBEL, 1962). Acest model, *universal* valabil în lumea vie, corespunde funcţiilor materialului genetic, deoarece explică modul în care se *stochează, se transmite şi se exprimă informaţia ereditară*. Gena încetează să mai fie o entitate "misterioasă", are o structură chimică complexă şi bine definită, iar ADN devine nu numai esenţa geneticii ci şi un veritabil *simbol al vieţii*. Consecinţele pentru practica medicală ale revoluţiei

[1] La unele virusuri materialul genetic este ARN; ele sunt numite "retrovirusuri" deoarece în timpul infecţiei se integrează în genomul celular după ce ARN-ul lor a fost convertit în ADN, de către enzima "revers transcriptază" (sau transcriptază inversă). Unele din aceste virusuri produc cancere şi alte îmbolnăviri (SIDA).

determinate de către descoperirea structurii şi funcţiei ADN sunt şi vor fi atât de spectaculoase încât nu vor avea egal în istoria medicinii.

1. STRUCTURA PRIMARĂ ŞI SECUNDARĂ A ADN.

1.1. STRUCTURA PRIMARĂ A ADN.

ADN este un *macropolimer de "deoxiribonucleotide"*. Lungimea şi greutatea sa moleculară sunt foarte mari, permiţând stocarea unei cantităţi uriaşe de informaţie. Cantitatea de ADN variază de la specie la specie (la om g.m.=3,5 x10^{12} daltoni) dar este *constantă* la indivizii aceleiaşi specii, precum şi în toate celulele somatice (diploide) de la acelaşi individ.

Unitatea structurală a ADN este **deoxiribonucleotidul,** alcătuit din trei elemente distincte: *un glucid* cu cinci atomi de carbon (o pentoză), *o bază azotată* şi un *grup fosfat* - unite prin legături *covalente* (puternice) (figura 2.3). Pentoza este reprezentată de D-2-**deoxiriboza,** în forma sa furanozică. **Baza azotată** poate fi purinică - *adenina* (A), *guanina* (G) - sau pirimidinică - *timina* (T), *citozina* (C); se leagă la C_1' al deoxiribozei, alcătuind împreună un **nucleozid**. Grupul fosfat (provenit din acidul ortofosforic) se leagă la C_5' al deoxiribozei, formând cu aceasta şi baza azotată un **nucleotid**, unitatea fundamentală a structurii catenei de ADN**.** Grupul fosfat conferă moleculei de ADN caracterul de "acid" şi numeroase sarcini negative, neutralizate *in vivo* prin fixarea histonelor, proteine bazice. În ADN, există *patru tipuri de deoxiribonucleotide* - acid deoxiadenilic, deoxiguanilic, deoxicitidilic, deoxitimidilic - care se vor deosebi numai prin baza azotată; gruparea fosfat şi deoxiriboza sunt elemente constante.

Polimerizarea nucleotidelor, în molecula de ADN, se realizează prin **legături covalente 3'- 5' fosfodiester**, formate între gruparea OH a C_3 al deoxiribozei unui nucleotid şi restul fosfat fixat la C_5 al nucleotidului următor. Se formează astfel o catenă (lanţ) *continuă, lineară* (neramificată!), care reprezintă **structura primară a ADN**. Această catenă prezintă o parte "constantă", fosfoglucidică (în care gruparea fosfat alternează regulat cu deoxiriboza), ce formează axul catenei, şi o parte "variabilă", reprezentată de bazele azotate, care se fixează perpendicular şi lateral pe "coloana vertebrală" fosfoglucidică (bazele azotate de pe aceeaşi catenă nu se leagă între ele) (figura 2.4).

În catena de ADN poziţia unui nucleotid *nu impune cu necesitate* în vecinătatea sa prezenţa unui anumit alt nucleotid: poziţiile adiacente pot fi ocupate de *oricare* din cele patru tipuri de nucleotide. Deci, nu există *nici o restricţie* în dispunerea / succesiunea nucleotidelor în lungul catenei de ADN sau, altfel spus, există *o libertate totală de aşezare a nucleotidelor*. Acest lucru este esenţial deoarece secvenţa (ordinea) nucleotidelor în lungul catenei de ADN reprezintă **informaţia genetică codificată**, pe baza căreia se stabileşte *ordinea aminoacizilor în proteine*. Sensul de "citire" al informaţiei genetice este determinat de **polaritatea 5' → 3'** a catenei de ADN . Ea este dată de faptul că poziţiile 5'-fosfat a primului nucleotid şi 3'-hidroxil a ultimului nucleotid al catenei sunt *libere*, neangajate într-o legătură chimică. Orice secvenţă de nucleotide se "citeşte" în direcţia 5' → 3' şi se scrie cu capătul 5' la stânga, de ex. 5'-ATGCCTAGATCA-3'. Fiecare catenă a ADN este deci o *secvenţă orientată*, definită prin înlănţuirea nucleotidelor.

1.2. STRUCTURA SECUNDARĂ A ADN.

În elaborarea modelului structurii ADN-ului, WATSON şi CRICK s-au bazat pe studiile difracţiei cu raze X a moleculelor de ADN (M. Wilkins, R. Franklin) precum şi pe analizele chimice ale ADN (Chargraaf).

Imaginile obţinute prin difracţie cu raze X a unor molecule de ADN de origini diferite erau totdeauna asemănătoare, relevând, deci, un "model unic" şi sugerând că moleculele de ADN au o organizare bine definită, ordonată, în care părţile componente se repetă ele însele. Modelul sugerează existenţa mai multor catene polinucleotidice şi o structură helicală ordonată. Analizele chimice ale ADN au evidenţiat că suma bazelor purinice (A+G) este însă întotdeauna egală cu suma bazelor pirimidinice (T+C) iar raportul A/T şi G/C este unitar, indiferent de specie; în schimb raportul A+T/G+C este diferit de 1 şi caracteristic speciei fiecărei specii; la om este 1,7.

Prelucrând creator aceste date, Watson şi Crick au propus un model al moleculei de ADN

alcătuit din **două catene polinucleotidice**, legate între ele prin bazele azotate, în mod *complementar* (figura 2.5 A) şi înfăşurate *plectonemic* pentru a forma o *dublă spirală elicoidală* (o elice dublă) orientată spre dreapta, cu diametrul de 20 Å şi pasul elicei de 34 Å (figura 2.5.B). Pornind de la faptul că raportul A/T = G/C = 1, Watson şi Crick consideră că în molecula de ADN se produce o împerechere "*preferenţială*" a bazelor care unesc cele două catene; bazele azotate (situate spre interiorul moleculei) se leagă **complementar**: o bază purinică se uneşte cu o bază pirimidinică sau, mai exact **A − T şi G − C** (formând un cuplu sau o pereche de baze, prescurtat **pb**). Legăturile se realizează prin *punţi de hidrogen*, legături electrostatice slabe (figura 2.5 A). În felul acesta secvenţa nucleotidelor unei catene *determină cu necesitate* secvenţa nucleotidelor celeilalte catene. Deci, cele două catene ale ADN nu sunt identice, ci *complementare şi strict codeterminate*. Cunoaşterea secvenţei nucleotidice a unei catene va permite automat determinarea secvenţei nucleotidice a celeilalte catene. De exemplu:

5'-ATGCCAG-3'
3'-TACGGTC-5'.

În acest context vom sublinia o idee asupra căreia vom reveni: **legea complementarităţii** bazelor stă la baza mecanismelor prin care se realizează funcţiile genetice ale ADN: transcripţia, replicarea, repararea leziunilor, recombinarea.

> Libertatea totală de aşezare a nucleotidelor în lungul catenelor de ADN (pe verticală) se asociază cu necesitatea dispoziţiei lor complementare (în planul orizontal al moleculei). "Libertatea şi necesitatea" dau substratul eredităţii înalta sa diferenţiere şi capacitate de a stoca, exprima şi transmite perfect mesajul pe care îl deţine" (Parot, 1985). În molecula simbol a vieţii este astfel "înscris" unul din principiile filosofice fundamentale ale existenţei omului: *libertate şi necesitate.*

Legăturile stereochimice / spaţiale necesare pentru împerecherea corectă dintre A−T şi G−C fac ca *orientarea (polaritatea) celor două catene să se dirijeze în sensuri opuse*, deci, să fie **antiparalele**. Acest lucru are consecinţe importante în *"citirea" informaţiei* în procesul sintezei proteice, precum şi în mecanismul replicării (biosintezei unor noi molecule de ADN).

Cele două catene ale ADN se înfăşoară (se împletesc) *plectonemic* (una în jurul alteia, ca "o frânghie", şi amândouă în jurul unui ax central (imaginar) al moleculei, formând o *dublă spirală elicoidală coaxială* (o elice dublă), orientată spre dreapta (dextrogir) (figura 2.5 B). Ea poate fi comparată cu o "scară în spirală" în care axele fosfoglucidice formează marginile scării iar perechile de baze, treptele ei. Această structură, asociată funcţiilor majore pe care le îndeplineşte ADN, a fost plastic numită *"elicea vieţii",* fiind un veritabil simbol al lumii vii.

Structura ADN este, în ansamblul ei, *perfect regulată*, ordonată: diametrul moleculei 2 nm; o tură completă are 360^0; pasul elicei 3,4 nm permite dispunerea a 10 perechi de baze **(**figura 2.5. b). În configuraţia ei spaţială, molecula de ADN prezintă *două şanţuri laterale*: unul mai mic şi altul mai mare. Ele sunt importante în *recunoaşterea* stereochimică şi fixarea pe ADN a *histonelor* (la nivelul şanţului mici) sau a unor *molecule proteice reglatoare* (la nivelul şanţului mare), singurul loc în care bazele sunt *accesibile* acestor proteine care vor influenţa (regla) realizarea funcţiilor ADN.

În condiţii fiziologice, molecula de ADN are o mare *stabilitate metabolică*, datorită legăturilor fizico-chimice dintre elementele unei catene precum şi dintre cele două catene [2]. Ele sunt strâns legate una de alta şi de obicei nu se pot separa. Această stabilitate este o condiţie obligatorie pe care trebuie să o îndeplinească substratul material al eredităţii. Totuşi, sub acţiunea unor enzime cele două catene ale ADN *se pot desface parţial*, pe segmente limitate, şi funcţionează ca "matriţă" pentru sinteza unor molecule noi, complementare (ARNm în procesul de transcripţie, sau o altă catenă ADN, în cursul replicării).

---

[2] Deşi legăturile de hidrogen sunt legături electrostatice slabe, multitudinea lor asigură "coeziunea" catenelor.

CASETA 2.1.

Denaturarea şi hibridizarea ADN.

În condiţii experimentale se poate produce ruperea (desfacerea) legăturilor de hidrogen dintre cele două catene, prin denaturare termică (încălzire la 63-100°C) sau chimică (tratament cu alcali etc.) (figura 2.6). Acest proces de conversie a ADN de la forma bicatenară la starea monocatenară se numeşte ***denaturare****. Prin răcirea lentă a soluţiei, monocatenele de ADN se pot reasocia pe baza complementarităţii şi refac structura originală; procesul se numeşte* ***renaturare*** *sau* ***hibridare****. Viteza de reasociere este funcţie de concentraţia ADN şi timp (se numeşte cot de la concentraţie x timp; valoarea cot la care se produce o asociere de 50% se numeşte cot 1/2). Prin răcire bruscă monocatenele ADN rămân separate şi pot fi folosite pentru realizarea unor* ***hibrizi moleculari*** *(pe baza complementarităţii dintre catene) de tip ADN-ADN, fie între două molecule de ADN de la specii diferite fie între fragmente de ADN obţinute artificial ("sonde", ce corespund unei gene) şi regiunea corespunzătoare, complementară din ADN nativ. Se pot obţine de asemeni hibrizi între o catenă ADN şi o moleculă de ARN complementară (de tip ARNm) rezultând un heteroduplex. Fenomenele de denaturare şi hibridare sunt amplu utilizate în biologia moleculară, în tehnicile ADN recombinant, pentru identificarea sau localizarea unor gene şi, mai recent, în terapia cu* ***oligonucleotide antisens*** *(în cancere, SIDA) care se fixează pe secvenţe de ADN sau pe ARNm şi blochează expresia genelor.*

1.3. RELAŢIILE DINTRE STRUCTURA ŞI FUNCŢIILE ADN

Modelul structurii ADN întruneşte toate condiţiile pe care trebuie să le îndeplinească *materialul genetic*:

- să stocheze o cantitate mare de informaţie, într-o formă stabilă, dar uşor de exprimat;
- să *reproducă* informaţia, deci să o *transmită* cu mare fidelitate de la o generaţie la alta, eventual să o *"repare"* corect, dacă se produce o leziune;
- să *exprime* informaţia genetică prin sinteza unor proteine specifice;
- să fie capabil de *variaţie*.

Aceste proprietăţi fundamentale şi caracteristice ale ADN îi conferă calitatea de a fi *molecula esenţială a vieţii.*

a. Informaţia genetică

ADN deţine, prin genele pe care le posedă, informaţiile necesare pentru ca celulele să trăiască, să se multiplice şi să se diferenţieze (căpătând anumite specializări). În ansamblul organismului, ADN determină şi controlează embriogeneza, dezvoltarea, creşterea, metabolismul şi reproducerea - deci toate procesele majore ale funcţionării organismului uman.

Informaţia genetică necesară acestor procese este reprezentată de *secvenţa liniară (succesiunea sau ordinea de înlănţuire) nucleotidelor în molecula de ADN*; ea determină structura proteinelor care alcătuiesc celulele şi ţesuturile şi participă la funcţionarea lor complexă. Proteinele sunt formate din lanţuri de aminoacizi; secvenţa aminoacizilor în proteină determină proprietăţile caracteristice ale fiecărei proteine; această *ordine specifică a aminoacizilor este determinată de secvenţa nuclotidelor în ADN.*

Informaţia ereditară este *codificată*, fiind scrisă într-un limbaj foarte simplu, cu ajutorul unui *"alfabet nucleic"* ce are numai patru *"litere"*: **A, T, G** şi **C** (corespunzătoare celor patru tipuri de nucleotide). Folosind aceste elemente de cod se pot scrie *"cuvinte"* de trei litere, asamblate într-o *"frază"* ce alcătuieşte o genă. La fiecare triplet de nucleotide, numit **codon** corespunde pe baza **codului genetic** (vezi capitolul 4), un anumit aminoacid din structura proteinei sau un "semnal" necesar pentru a începe sau termina lectura mesajului (figura 2.7).

Gena este unitatea de informaţie ereditară; ea este alcătuită dintr-o *succesiune specifică de codoni*, ce determină *ordinea aminoacizilor într-un polipeptid* şi, prin aceasta,

funcţia lui. Modificarea secvenţei nucleotidelor prin **mutaţia** genei va duce la modificarea unui / unor codon(i) şi, de cele mai multe ori, la modificarea structurii şi funcţiei proteinei sintetizate .

b. Expresia informaţiei ereditare

Expresia informaţiei ereditare reprezintă, în esenţă, sinteza de proteine.

Informaţia genetică codificată din ADN nu este folosită direct în sinteza proteinelor (figura 1.1 şi 2.7). Ea este mai întâi copiată - **transcripţie** - într-o moleculă de ARNm, folosind acelaşi cod şi mecanismul complementarităţii. Urmează apoi **translaţia** sau decodificarea informaţiei genetice din ARNm într-o *secvenţă specifică de aminoacizi* a proteinei, pe baza corespondenţei dintre fiecare codon şi un anumit aminoacid.

Copierea informaţiei în ARNm se face numai de *pe una din catenele ADN*, catena 3'→5', numită *catenă copiată sau matriţă*[3]. Ea este totdeauna aceeaşi pentru o anumită genă dar la gene diferite poate fi una sau alta din catenele ADN. Catena ADN complementară catenei transcrise este similară cu ARNm ca secvenţă (exceptând înlocuirea timinei cu uracilul) şi direcţie (5' → 3') şi se numeşte *catenă de referinţă ("sens")*. După desfacerea enzimatică, temporară, a legăturilor de hidrogen dintre cele doua catene ale ADN, copierea se face în direcţia 3' → 5', sintetizându-se o *moleculă complementară şi antiparalelă* (5' → 3') de **ARNm**; ea va avea aceeaşi secvenţă şi orientare ca şi catena de referinţă. De aceea, *notarea şi descrierea unei gene se fac, convenţional, referindu-se la catena 5' → 3' de referinţăa ADN.*

Mult timp s-a considerat că transferul de informaţie se face într-o singură direcţie: ADN→ARNm→Proteină. Această "dogmă fundamentală a geneticii" a fost reevaluată prin identificarea **"transcripţiei inverse**", de la ARNm → ADN. Prin acest mecanism **retrovirusurile**, care au ca material genetic ARN, se pot *încorpora* în genomul celulei-gazdă, confecţionându-şi o copie complementară de "tip ADN". Fenomenul este larg folosit astăzi şi în "ingineria genetică" (vezi capitolul 3.C.3) pentru obţinerea unor molecule de **ADN complementar** faţă de ARNm extras din celule; în fond acest **ADNc** reprezintă gena (mai exact partea codantă) pe baza căreia se va sintetiza ARNm şi apoi proteina corespunzătoare.

c. Replicarea şi repararea ADN

O proprietate *esenţială* a ADN este capacitatea de a servi ca model (matriţă) pentru autoreplicarea sa şi sinteza unor noi molecule, *identice informaţional* între ele şi cu molecula iniţială. Pentru aceasta, cele două catene ale ADN *se desfac* şi fiecare serveşte ca *matriţă* pentru aranjarea *secvenţială şi complementară* a deoxiribonucleotidelor. Prin polimerizare lor se formează o catenă *"nouă"* care reface împreună cu catena *"veche"* o moleculă de ADN (vezi figura 1.1). Replicarea semiconservativă a ADN este *cheia eredităţii*: un organism parental transmite prin gameţi o replică a ADN-ului său primei celule a descendenţilor. Astfel, prin replicare, *informaţia ereditară se perpetuează* în mod stabil în cursul generaţiilor.

Uneori în cursul replicării se pot produce *erori*, prin împerecheri "nelegitime" (greşite) ale nucleotidelor (de tipul C-C, A-G sau A-C). Ele ar putea produce o modificare a informaţiei genetice dacă nu ar interveni un *mecanism enzimatic de "reparare";* pe baza catenei matriţă, aceasta corijează erorile de replicare (vezi capitolul 5.A.1)

2. POLIMORFISMUL STRUCTURAL ŞI FLEXIBILITATEA MOLECULEI DE ADN

Forma clasică a structurii ADN, descrisă de Watson şi Crick, corespunde **conformaţiei de tip B**, care se realizează frecvent "in vivo" (în condiţii de umiditate crescută şi concentraţie ionică joasă). S-au descris însă şi alte conformaţii sau **isoforme**: ***A*** *şi* ***C,*** mai frecvente, ***D*** *şi* ***E***, mai rare. Ele au *acelaşi plan general de structură*: elice dublă orientată spre dreapta dar se deosebesc de tipul B printr-o serie de particularităţi fizice (înclinarea bazelor faţă de ax, modificarea pasului elicei şi numărul de baze per tură elice): *forma A este mai scurtă şi mai groasă, iar celelalte mai lungi şi mai subţiri.*

[3] Catena 3'→5' se mai numeşte şi *catenă antisens* deoarece prin convenţie ARNm este considerat *catena sens*

În organism, în anumite regiuni ale moleculei de ADN (cu o anumită secvenţă nucleotidică) se produc frecvent modificări (tranziţii) conformaţionale A ↔ B ↔C. Aceste modificări permit *recunoaşterea* segmentelor respective de către anumite molecule exogene, care *reglează expresia genelor*.

În 1979, Rich şi Dickerson descoperă un tip particular de **ADN-Z** sau **ADN-senestra**. El are o moleculă dublu elicală, *orientată spre stânga*, care îşi pierde simetria caracteristică formei B, deoarece axul fosfo-glucidic ia o formă neregulată în *zig-zag*, producând deformarea şi alungirea moleculei de ADN (figura 2.8). Conformaţia ADN-Z este o conformaţie *normală,* există "in vivo" şi apare, în anumite condiţii fizico-chimice, în regiunile bogate în perechi de baze G-C, prin tranziţia / conversia formei B (sub acţiunea unei topoisomeraze, prin rotarea bazelor cu 180°); *tranziţia B ↔ Z este reversibilă*.

ADN-Z intervine foarte probabil în *inactivarea unor gene* şi, deci, în controlul expresiei informaţiei genetice. Conversia locală B → Z (mai ales în situsurile de reglare a transcripţiei) poate fi realizată prin *fixarea* mai intensă a *histonelor* sau a altor molecule ce produc represia genelor sau prin *metilarea citozinei* din situsurile GC. Astfel, un "viraj la stânga" la începutul unei gene determină stoparea activităţii ei.

Tranziţia B ↔ Z ar determina însă şi evidenţierea unor situsuri din ADN în care se fixează mai facil agenţi mutageni sau cancerigeni. Pentru aceasta pledează faptul că mutaţiile apar mai frecvent la nivelul secvenţelor G-C care iau conformaţia Z.

În finalul acestei prezentări este important de subliniat faptul că tranziţia ADN B↔Z ca şi modificările conformaţionale A ↔ B ↔ C care apar în anumite regiuni ale ADN (cu o secvenţă specială a nucleotidelor), demonstrează elocvent faptul că molecula *de ADN nu are o structură fixă, rigidă, încremenită*. În funcţie de condiţiile de mediu, moleculele ADN sînt *flexibile,* într-o permanentă stare dinamică, deformându-se neîncetat; pe drept cuvânt se poate spune că molecula de ADN (simbolul vieţii) *"pulsează sau respiră"*.

C. STRUCTURA GENOMULUI UMAN

Termenul de **genom** a fost creat (Winkler, 1920) pentru a denumi *setul haploid* de cromosomi din gameţii eucariotelor. Ulterior el a fost folosit pentru a desemna *ansamblul genelo*r unui organism dar descoperirea ADN necodant, diferitelor clase de ADN repetitiv şi altor elemente de „anatomie”, au dus la semnificaţia actuală a genomului, conceput ca *ansamblul complex al secvenţelor de ADN a unui individ sau specii.*

Cunoştinţele despre genomul uman au fost dependente în timp de metodele folosite. Descoperirea tehnologiei ADN recombinant a marcat începutul unei perioade revoluţionare pentru biologie în general şi medicină în special. În 1980 a apărut ideea *Proiectului Genom Uman*, care treptat a început să prindă contur, devenind în 1990 un important proiect internaţional destinat să stabilească harta fizică şi genetică a genomului uman şi, în final, să determine întreaga secvenţă a ADN uman dar şi altor organisme (veyi capitolul 3.D.4). Coordonarea cercetărilor a fost realizată de *Human Genome Organization (HUGO)*, care după descoperirea hărţii genetice a omului (1995) a propus *descifrarea întregii secvenţe* a genomului uman**.** Proiectul demarează însă abia în 1999 şi doi ani mai tîrziu, la 15 februarie 2001, *International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC)* precum şi compania privată *Celera Genomics* au publicat **prima schiţă (ciornă) a secvenţei genomului uman**, ce acoperă 96% din partea eucromatică (activă) a genomului uman; heterocromatina este greu de clonat datorită structurii sale repetitive şi se consideră că nu are sau are doar câteva gene. Deşi mai sunt multe de făcut până la finalizarea completă (în 2003) a proiectului (stabilirea unei secvenţe continue, unice, pentru cei 24 de cromosomi umani şi a poziţiei precise a tuturor genelor) iar unele detalii se vor schimba, există multe puncte clare. De aceea, în prezentarea organizării genomului uman, vom ţine cont în special de aceste elemente certe.

1. DATE GENERALE.

Cantitatea totală de ADN din celulele umane diploide a fost apreciată la 7 picograme sau 3,5 picograme per genom haploid, ceea ce corespunde teoretic la circa 3,3 miliarde de perechi de baze (pb). Mărimea genomului haploid este *constantă* la fiecare specie şi se mai numeşte *valoare C*; ea prezintă evident variaţii în cursul ciclului celular: 2C la sfârşitul diviziunii şi faza G1, 4C după replicarea ADN în faza S şi în G2.

Mărimea totală estimată a genomului uman, apreciată de IHGSC în 2001, este de ***3,2 Gb*** (gigabaze = miliarde de baze); din acestea 2,95 Gb reprezintă eucromatina, segmentul „funcţional" al genomului, iar restul heterocromatina inactivă. Surprinzător este că *secvenţele codante reprezintă mai puţin de 5% din genom* (numai 1,1% -1,4% sunt secvenţe ce codifică proteine) iar *numărul prognozat de gene este cuprins între 30.000 şi 35.000*, jumătate faţă de estimările anterioare (din acestea numai 26.000 au fost identificate, deşi la multe încă nu se cunoaşte cu precizie rolul, efectul lor). Deci genele, ce conţin ADN "codant", sunt pur şi simplu nişte *"insule"* într-un *"ocean"* de ADN necodant; acestă dispoziţie este nu numai surprinzătoare (prin logica "economiei" sau "rentabilităţii") dar şi misterioasă. Cert este că *genomul nu poate fi considerat o succesiune de gene pe cromosomi ci o structură cu arhitectură complexă* în care genele (fragmentate) sunt dispersate pe cromosomi şi separate prin largi regiuni intergenice, necodante. Acest ADN necodant (numit uneori şi *"egoist"*, deoarece nu participă la formarea de proteine) nu este probabil în totalitate *"inutil":* evidenţierea unor secvenţe perfect organizate, din care unele sunt chiar transcrise, sugerează că cel puţin o parte din acest ADN ar putea juca un rol, pentru moment necunoscut.

Genomul uman este alcătuit dintr-un **genom nuclear** complex, ce conţine marea majoritate a ADN-ului celular (3,2 Gb) şi un **genom mitocondrial** simplu şi mic (16,6 Kb).

2. GENOMUL NUCLEAR

2.1. FRAGMENTAREA GENOMULUI UMAN.

Nucleul celulelor umane conţine peste 99 % din ADN celular. Această cantitate enormă de ADN este *fragmentată în 24 de tipuri distincte de molecule lineare de ADN* care, prin *asociere cu proteine* histonice şi nehistonice, formează *cromosomii*: 22 de tipuri distincte de *autosomi* şi doi cromosomi sexuali, X şi Y. *Mărimea* lor variază de la 244 Mb pentru cromosomul 1 la 44 Mb pentru cromosomul 21 iar structura lor este *neuniformă*, prin compoziţie nucleotodică şi densitate de gene, producând un model caracteristic de benzi, colorate şi necolorate, pentru fiecare cromosom.

2.2. HETEROGENITATEA SECVENŢELOR NUCLEOTIDICE A ADN.

In genomul uman există mai multe *"clase"* de ADN, diferite prin repetiţia secvenţelor nucleotidice: ADN nerepetitiv, ADN moderat repetitiv şi ADN înalt repetitiv.

a. **ADN nerepetitiv**

ADN nerepetitiv (60%) este alcătuit din *secvenţe unice per genom* sau în număr foarte mic de exemplare (formând familii multigenice); se găseşte mai frecvent în regiunile cromosomice active transcripţional, mai puţin condensate, cunoscute sub numele de *eucromatină*. Doar o mică parte (2%) din ADN nerepetitiv alcătuieşte *regiunile codante ale genelor ce codifică proteine* (exonii). Ele sunt transcrise de ARN polimeraza II şi, de aceea, se numesc *"gene de clasă II"*. Restul ADN-ului nerepetitiv este *necodant* şi are funcţii încă necunoscute; se găseşte în interiorul genei (introni) şi în regiunile ce separă genele.

b. ADN moderat repetitiv

ADN moderat repetitiv (30 %) este alcătuit din *secvenţe scurte*, de 300-1000 pb (rar mai mari), *repetate de zeci şi sute de mii* de ori şi *dispersate* în genom; majoritatea secvenţelor moderat repetitive sunt transcrise în ARN şi formează frecvent *"familii"* de secvenţe înrudite, unele cu funcţie cunoscută (codante pentru ARNr şi ARNt), altele cu funcţie necunoscută

(secvenţele SINEs sau LINEs).

- *Genele ribosomale*, pentru ARNr[4], sunt transcrise de ARN polimeraza I (şi numite "gene de clasă I"). Ele se găsesc în unităţi repetate în tandem ce formează 150-200 copii, localizate pe braţele scurte ale cromosomilor acrocentrici, în regiunile "organizatorilor nucleolari", care formează nucleolii în nucleul interfazic; excepţie fac genele pentru ARNr 5S situate pe cromosomul 1q42, aproape de telomer.
- *Genele pentru ARNt* (şi alte molecule mici de ARN), transcrise de ARN polimareza III ("gene de clasă III") sunt organizate în grupe de gene repetate în tandem şi localizate în diferiţi cromosomi (mai ales 1 şi 6).
- *Secvenţele SINEs* ("short interspersed repeated sequences") sunt secvenţe scurte de 100-400 p.b., existente în circa 500.000 de copii (3-5% din genom), dispersate în cromosomi;ele sunt reprezentate în special de *familia Alu*[5]. Funcţia lor nu este cunoscută; s-a presupus că ar avea un rol în iniţierea replicării în diferite puncte ale ADN. Secvenţele Alu pot acţiona ca *elemente transpozabile*.
- *Secvenţele LINEs* ("long interspersed repeated sequences") au lungimea de 6-7 kb, se află în circa 100.000 copii, dispersate în genom; se cunosc familia L1 (sau Kpn 1) şi The 1. Ca şi secvenţele Alu par să multiplice prin retrotranspoziţie. Secvenţele LINEs au foarte probabil rol în *împerecherea corectă* a cromosomilor omologi în meioză, condiţie esenţială pentru *schimbul egal* de segmente cromosomice. Se consideră că prin împerechere incorectă între secvenţe identice dar din poziţii şi uneori cromosomi diferiţi se pot produce (prin CO inegal) *recombinări aberante* care generează mutaţii şi deci boli genetice.

c. ADN înalt repetitiv

ADN înalt repetitiv (10 % din genom) este alcătuit din *secvenţe foarte scurte* (2-200 p.b.), *repetate în tandem* (→→→→), de *milioane* de ori; ele *nu sunt transcrise*. Unele secvenţe de ADN înalt repetitiv, numite si *ADN satelit* (α, β, 1, 2, 3) alcătuiesc *blocuri* mari de **heterocromatină constitutivă** în anumite regiuni cromosomice: centromer, telomere, constricţii secundare, benzile G, etc; ele au evident un *rol structural*[6]. Alte secvenţe *foarte scurte* (14-65 p.b.) şi *repetate în tandem* sunt *dispersate* în toţi cromosomii (excepţie X şi Y), ocupând anumite *situsuri precise*; aceste secvenţe formează **minisateliţii** hipervariabili (sau VNTR de la "variable number of tandem repeats"). Mai există secvenţe de 1-13 p.b., formate de regulă din repetiţia unui dinucleotid (în special AC Şi AT), cu o structură foarte polimorfă şi cu o distribuţie uniformă în genom; ele se numesc **microsateliţi** (STR sau VNDR).

> Minisateliţii sunt alcătuiţi dintr-o regiune centrală, cu o secvenţă identică (ce poate fi pusă în evidenţă cu o sondă specifică) şi regiuni periferice variabilă. Ei sunt nişte veritabili *markeri genetici individuali*: numărul de repetiţii al secvenţei unui minisatelit variază de la o persoană la alta. Numărul mare de minisateliţi şi de variante pentru fiecare din ei fac ca probabilitatea întâlnirii a doi indivizi identici (dar neînruditi) cu acelaşi profil să fie mai mică de 10^{-20}. Minisateliţii reprezintă **"amprenta genetică"** a fiecărui individ (figura 2.11) folosită astăzi în: medicina legală, cartografierea genomului uman, diagnosticul molecular al bolilor genetice, analiza cromosomică.

Mai recent, IHGSC (2001) stabileşte că **secvenţele repetitive** alcătuiesc mai mult de 55% din schiţa genomului uman şi le împarte în cinci clase: (1) repetitii dispersate, produse de *transposoni*; (2) copii inactive a genelor sau *pseudogene*; (3) *repetitii de secvenţe simple* (SSRs); (4) *duplicaţii segmentare* a unor blocuri de 10-300kb; (5) *blocuri repetate în tandem*, localizate la centromer, telomere, braţe scurte cromosomi acrocentrici.

- Cele mai multe secvenţe repetitive (circa 45%) sunt derivate prin transpoziţie. La mamifere şi om, elementele transposabile sunt de patru feluri: LINEs, SINEs, retrotransposoni LTR (elemente asemănătoare retrovirusurilor) şi transposoni ADN „fosili" (asemănători cu Tn bacterieni). Primele trei categorii *transpozează* prin intermediul unei copii de ARN, care sub acţiunea unei *transcriptaze inverese* va forma o copie de tip ADN ce se va introduce într-un alt loc din ADN.
- Repetiţiile de secvenţe simple (SSRs, de la *Simple Sequence Repets*) sunt reprezentate în special de *microsateliţ*, repetiţii scurte (n=1-13 pb) şi *minisateliţi, repetiţii mai lungi* (n=14-500 pb). SSRs sunt produse foarte probabil prin devieri frecvente de împerechere (*slippage*=alunecare, patinare) în cursul replicării ADN. Formează circa 3% din genom, cele mai frecvente fiind repetiţiile dinucleotidice (0.5%) în special AC şi AT; se găsesc câte una la fiecare 2kb.

---

[4] Subunitatea mare a ribosomului conţine ARNr 28S, 5,8 S şi 5S iar subunitatea mică ARNr 18 S.

[5] Denumirile Alu, Kpn, The - provin de la enzimele cu care aceste secvenţe sunt "decupate" din genom.

[6] ADN satelit α (sau *alphoid*) este specific fiecărui cromosom şi poate fi evidenţiat, chiar în nucleul interfazic, cu sonde centromerice specifice

- caracteristică remarcabilă a genomului uman este *duplicaţia segmentală* a unor porţiuni/blocuri (1-200kb, majoritatea >10kb) din secvenţa genomică în una sau mai multe locaţii, pe acelaşi cromosom (duplicaţii intracromosomice[7], mai ales pericentromerice) sau pe cromosomi diferiţi (duplicaţii intercromosomice[8]). Ele alcătuiesc circa 5% din genomul uman. Interesant este faptul că multe duplicaţii s-au produs foarte recent în evoluţia spre om, lipsind la specii apropiate.

Secvenţele repetitive au fost considerate „deşeuri" neinteresante. Şi totuşi ele s-au dovedit a fi markeri paleontologici valorosi pentru a înţelege evoluţia populaţiilor umane, selecţia şi mutaţiile. Au permis înţelegerea structurii şi dinamicii cromosomilor. Mai mult, ca agenţi activi, repetiţiile au remodelat genomul uman, producând rearanjamente care au modificat genele existente (producând mutaţii) sau au creat gene noi. Dacă menţionăm, în final, şi valoarea lor ca instrumente de testare / diagnostic în genetica medicală[9] atunci cu siguranţă nu le vom considera „un gunoi" si va trebui să le acordăm atenţia necesară.

2.3 ADN GENIC

Genomul nuclear este alcătuit din: *ADN genic (25 %) şi ADN extragenic (75 %)*. (Figura 2.9). ADN genic conţine secventele codante si necodante din structura genelor active, fragmentelor de genă sau genelor inactive (pseudogene).

Gena este unitatea de informaţie genetică sau ce codifică *un produs primar specific* (proteine sau ARN necodant). Structura genelor este foarte complexă (vezi capitolul 3) dar toate genele prezintă o regiune centrală, transcrisă, flancată de două regiuni laterale, netranscrise, cu rol reglator. Regiunea centrală (*„cadru de lectură"* sau *ORF* de la „open reading frame") este *fragmentată* în secvenţe codante (*exoni*) separate de secvenţe necodante, intercalare (introni). ADN genic se împarte deci în *ADN codant* (10 %) (reprezentat de exonii celor circa **35.000 de gene** ce codifică proteine sau alte molecule de ARN) şi *ADN necodant* (90%) alcătuit din introni, gene sau fragmente de gene nefuncţionale (pseudogene).

Genele sau cel puţin regiunile lor codante alcătuiesc numai *o mică fracţiune din genomul uman (mai putin de 5 %)* dar ele reprezintă funcţia biologică majoră a genomului şi scopul final al proiectului. Identificarea lor este însă o sarcină dificilă mai ales datorită dimensiunilor mici ale exonilor. Genele genomului nuclear se pot împărţi în două categorii: gene ce codifică proteine şi gene ce codifică diferite clase de ARN necodant.

Gene ce codifică proteine reprezintă circa 1,5 % din genom. Studiile *IHGSC* au arătat că: există o variaţie considerabilă în *mărimea* genelor (în special pe seama intronilor) precum şi în *distribuţia* lor: regiunile bogate în GC (din benzile G negative) au o mare densitate genică iar genele sunt mai compacte comparativ cu regiunile bogate în AT (benzile G pozitive), mai sărace în gene; *densitatea* genelor este mai mare în regiunile subtelomerice iar unii cromosomi (de ex., 19 şi 22) sunt mai bogaţi în gene decât alţii (de ex., 4 şi 18). Un element remarcabil este faptul că aproximativ 35% din genele umane suferă matisare alternativă, generând, prin selecţia exonilor, mai mulţi produşi diferiţi structurali şi funcţionali (deci cele circa 35000 de gene produc aproape un număr triplu de proteine). Un procent din genele umane exprimate sunt membri ai unor **familii de gene** care prezintă o mare similitudine a secvenţei, structurii si funcţiei lor (vezi capitolul 3).

Genele pentru ARN necodant (ncARNs) sunt împărţite (după *IHGSC*, 2001) în mai multe clase majore: (1) gene pentru *ARN de transfer* (tARN); (2) gene pentru *ARN ribosomal* (rARN); (3) gene pentru *ARN nucleolar mic* (snoARN) necesar procesării rARN; (4) gene pentru *ARN nuclear mic* (snARN) ce intervin în procesarea intronilor. Mai există şi alte tipuri: ARN telomeraza, Xist transcript etc.

---

[7] Pe cromosomul 17 există trei copii a unei secvenţe de circa 200kb, separate prin 5 Mb; copiile sunt atât de similare (99%identitate) încât generează prin recombinare paralogă sindroamele cu microdeleţii Smith-Magenis şi Charcot-Marie-Tooth 1A;

[8] un segment de 9,5kb din Xq28 ce conţine şi locusul pentru adrenoleukodistrofie, se găseşte duplicat, lângă centromer, pe cromosomii 2,10,16 şi 22

[9] Din cauza gradului înalt al polimorfismului de lungime dintr-o populaţie microsateliţii sunt markeri genetici valoroşi în testările genetice.

2.4. ADN EXTRAGENIC

ADN extragenic (75%) este alcătuit din secvenţe *inactive transcripţional*, unice sau repetitive. Secvenţele repetitive au fost clasificate (Strachan si Read, 1999) în două categorii:

- *ADN repetat în tandem şi grupat în "blocuri"* cu difertite localizări cromsomice; această categorie de ADN înalt repetitiv se numeşte generic ADN satelit şi se subîmparte în patru clase: megastelit, satelit, minisatelit şi microsatelit;
- *ADN repetat şi dispersat* în numeroase situsuri în spaţiul dintre gene; este reprezentat de scvenţele SINEs şi LINEs.

3. GENOMUL MITOCONDRIAL.

Genomul mitocondrial este definit printr-un singur tip de *ADN circular*, bicatenar (figura 2.10), format din 16.569 pb. Secvenţa sa nucleotidică a fost complet descifrată (Anderso et al, 1981) şi se caracterizează printr-o mare *densitate* de secvenţe codante. Cele două catene ale ADN mitocondrial au o compoziţie bazică diferită: o catenă "grea" (**H**) este mai bogată în guanină iar cealaltă catenă "uşoară" (**L**) în citozină. Într-o mică regiune, *bucla D*, ADN este alcătuit din trei catene, prin sinteza unei piese scurte adiţionale la catena H, cunoscută ca ADN 7S.

Fiecare celulă umană conţine câteva mii de copii ale ADN mitocondrial (ADNmt) şi de aceea cantitatea lui totală, raportată la ADN unei celule somatice, poate reprezenta *până la 0.5%*. În cursul diviziunilor celulare mitotice, moleculele de ADN mitocondrial ale celulei iniţiale segregă *la întâmplare* în celulele fiice.

Trebuie subliniat că genomul mitocondrial al zigotului provine *exclusiv de la ovul, deci de la mamă,* fapt ce determină un tip particular de *transmitere maternală* a genelor mitocondriale: de la mamă la toţi copiii săi.

Genomul mitocondrial mai prezintă cîteva elemente particulare, diferite de genomul nuclear: *NU este asociat cu proteine* histonice sau nehistonice şi *nu conţine ADN repetitiv* (tabelul 2.1). Genomul mitocondrial este extrem de *compact*: circa 93% din ADN esre format din secvenţe codante (absente doar în bucla D), ce formează **37 de gene** (28 pe catena H şi 9 pe catena L): 13 gene codifică polipeptide (constituienţi ai sistemului de fosforilare oxidativă), 22 gene codifică ARNt şi 2 gene ARNr (figura 2.13). Restul proteinelor mitocondriale sunt codificate de gene nucleare, sintetizate în citoplasmă şi importate în mitocondrii. Genele mitocondriale sunt aproape totdeauna *contigue* iar unele chiar *suprapuse;* ele *nu conţin introni*.

Transcripţia începe în promotorii (PH şi PL) aflaţi în bucla D, este *continuă* (deci multigenică) şi se desfăşoară în direcţii diferite pe cele două catene, generând *un transcript multigenic mare* (ce va fi ulterior secţionat în mai multe molecule de ARN). Codul genetic mitocondrial *diferă* puţin de cel nuclear. El are patru codoni stop (nonsens) din care doi sunt codoni sens în ADN nuclear; codonul stop UGA din ADN nuclear este codon sens în ADN mitocondrial. *Replicarea este unidirecţională* şi începe în puncte diferite de origine (O) p entru cele două catene[10].

Diferenţele dintre structura şi funcţia lor sunt prezentate sintetic în tabelul 2.1

Tabelul 2.1 Diferenţele dintre genomurile umane nuclear şi mitocondrial
(modificat după Strachan şi Read, 1999)

Caracteristici	Genom nuclear	Genom mitocondrial
Mărime	3200 Mb	16,6 Kb
Număr de molecule de ADN diferite	23 (la celulele XX) sau 24 (la celulele XY)	O moleculă circulară de ADN

[10] ADN mitocondrial, prin particularităţile sale structurale, net diferite de ADN nuclear, se aseamănă foarte mult cu ADN procariotelor ancestrale; de aceea si consideră că mitocondriile îşi au originea din includerea unei particule asemănătoare bacteriilor de către primele celule eucariote apărute în evoluţie.

Număr total de molecule de ADN per celulă	23 în celulele haploide şi 46 în celulele diploide	Câteva mii de
Asocierea cu proteine	Mai multe clase de histone şi proteine nehistonice	Neasociat cu proteine
Procentul de ADN codant	~ 5 %	~ 97 %
Număr de gene	~ 35.000 gene	37
Densitatea genelor	Mică (~ 1 la 40 kb)	Mare (~ 1 la 0.45 Kb)
Introni	Prezenţi în cele mai multe gene	Absenţi
ADN repetitiv	30 – 40 %	Foarte puţin
Transcripţie	Deobicei individuală	Transcripţie continuă a genelor multiple
Repararea leziunilor ADN	Mecanisme multiple, eficientă	Unele mecasnisme de reparare absente; mutaţiile se acumulează rapid.
Recombinare	Cel putin una pentru fiecare pereche de cromosomi meiotici	Absentă
Ereditate	Mendeliana pentru genele de pe autosomi şi cromosomul X; paternală pentru secvenţele de pe Y	Exclusiv maternă

ADN mitocondrial poate suferi mutaţii[11] producând o serie de boli degenerative (vezi capitolul 8), care sunt *transmise într-un mod specific, de la mamă la toţi descendenţii; bărbaţii bolnavi nu transmit boala.* Atunci cînd se produce o mutaţie în ADN mitocondrial rezultă în mitocondrie un amestec de molecule mutante şi normale, numit *heteroplasmie*. Cînd o celulă se divide ADN mitocondrial mutant va fi împărţit *la întâmplare* între celulele fiice şi astfel, în timp, procentajul de ADN mit mutant între diferite linii celulare şi ţesuturi va fi diferit, fenomen numit *segregare replicativă.* Studiul familiilor în care există heteroplasmie cu ADN mitocondrial mutant, relevă că procentajul ADNmt mutant creşte şi producţia de energie scade treptat, până sub un prag minimum necesar funcţionării normale a ţesutului, moment în care manifestările clinice devin evidente. De aceea bolile mitocondriale au un debut tardiv şi o evoluţie progresivă.

S-a demonstrat că ADN mitocondrial poate suferi *mutaţii somatice*, în celulele corpului după naştere, care se acumulează rapida datorită absenţei unor mecanisme de reparare. Astfel, aceste *mutaţii somatice* au probabil un rol important atât în debutul şi progresia bolilor mitocondriale, a unor boli degenerative precum şi în procesul de senescenţă.

4. SCHIŢA SECVENŢEI GENOMULUI UMAN

La 15 februarie 2001 a fost publicată *„Schiţa genomului uman”*. Acest lucru a fost realizat concomitent de International Human Genome Sequencing Consortium (un proiect public început în 1990, ce implică 20 de laboratoare şi sute de cercetători din întreaga lume) şi de Celera Genomics, o companie privată. Ambele schiţe prezintă secvenţa a circa 96% din regiunile eucromatice ale cromosomilor umani.

Mărimea totală estimată a genomului uman este de *3,2 Gb (gigabase), din care 2,95Gb reprezintă eucromatina*. Secvenţele codante curpind mai puţin de 5% din genom iar numărul prognozat de gene este cuprins între *30.000 şi 35.000.* Acest număr este relativ mic dacă îl comparăm cu 6.000 la o celulă de drojdie, 13.000 la drosofilă, 18.000 la un vierme şi 26.000 pentru o plantă. Se pune firesc întrebarea: *cine face diferenţa dintre om şi mamiferele superioare* (de ex. Cimpanzeul), ca să nu vorbim de celelalte organisme multicelulare. Este posibil un răspuns dacă comparăm...proteinele. Se estimează că genomul uman codifică 1.278 de familii de proteine dar numai 89 sunt specifice vertebratelor! (realizând complexitatea neuronală, coagularea sângelui, imunitatea, semnalizarea intra- şi intercelulară, dezvoltarea,

[11] Rata mutaţiilor ADNmt este de 10-15 ori mai mare decât a ADN nuclear, fapt ce duce la acumularea unui spectru larg de secvenţe polimorfice de ADN mt în populaţiile umane; analizând distribuţia acetor polimorfisme în populaţiile umane se pot obţine indicaţii privind evoluţia lor în timp.

apoptoza etc). Cele mai multe dintre funcţiile celulare – metabolismul bazal, transcripţia şi translaţia, replicarea, diviziunea – se realizează *la fel ca la bacterii* sau organismele unicelulare. Diferenţa majoră între om şi nevertebrate o reprezintă *complexitatea proteinelor*, structura lor *modulară* (pe domenii şi motive), care permite combinaţii noi. *"Istoria omului este de fapt o arhitectura nouă realizată cu piese vechi" (Baltimore D., 2001)*. La aceasta se adaugă interacţiunile complexe dintre proteine, mecanismele subtile de reglare a sintezei lor si nu în cele din urmă posibilităţile de a produce proteine diferite pe baza informaţiei dintr-o singură genă (matisare alternativă). Cert este că a înţelege cine determină enorma complexitate a fiinţelor umane rămâne o enigmă de rezolvat în viitor.

Ar mai fi o întrebare la fel de tulburătoare: *ce deosebeşte un organism uman de altul, evident la nivelul genomului, facându-ne pe fiecare unici?* Analiza schiţei genomului uman arată că oamenii diferă între ei prin circa o pereche de baze la fiecare mie de pb. Acest polimorfism al unui singur nucleotid (SNPs de la *single nucleotid polymorphisms*) reprezintă markerii noştri de individualitate cei mai valorosi, care determină probabil (dar nu stim cum) şi răspunsul la agresiuni (boala) şi efectele medicamentelor iar la scara mai mare abilitatea, memoria, coordonarea fizică, creativitatea etc. Cunoaşterea aprofundată a genomului uman ne va permite să învăţăm multe din această carte a vieţii.

Din multitudinea datelor ce însoţesc „*Schiţa secvenţei genomului uman*" vom sublinia câteva idei mai importante.

- Peisajul genomic prezintă o *mare variabilitate* în distribuţia unor caractere: gene, elemente transpozabile, conţinut de GC, distribuţia insulelor CpG, rata recombinărilor în meioză;
- Cele circa 35.000 de gene[12] au o *structură mai complexă* ca la alte vertebrate şi au posibilităţi de a genera (prin matisare alternativă) un număr mare de proteine;
- Întregul set de proteine (*proteom*) codificat de genomul uman este mai *complex* decât la nevertebrate; ele au domenii şi motive care pot fi aranjate în diferite structuri;
- Există *regiuni bogate şi sărace în GC*, care se corelează pozitiv cu densitatea genelor, benzile cromosomice, compoziţia secvenţelor repetitive, rata recombinărilor.
- Genele sunt distribuite inegal în genom. Unii cromosomi (de ex., 17, 19, 22) au o densitate mare de gene comparativ cu alţii (de ex., 4, 8, 13, 18 şi Y).
- *Insulele CpG* (în care nu se produce metilarea) se află frecvent la capătul 5' al genelor;
- *Rata de recombinare meiotică* între cromosomii omologi este mai mare pe breţele scurte, mare la capătul cromosomilor şi absentă la centromer;
- *Rata mutaţiilor* este de două ori mai mare în meioza masculină decît la femeie, deci cele mai multe mutaţii se produc la bărbat;
- Au fost identificate mai mult de *1,4 milioane de SNPs* ce prezintă un polimorfism foarte mare între indivizii unei populaţii (rata de heterozigozitate este de 1 la 1300 pb);
- Mai mult de jumătate din ADN reprezintă *secvenţe repetitive* de diferite tipuri. Este totuşi puţin probabil că tot acest "junk ADN" (deşeu/gunoi) reprezintă elemente "egoiste" ce parazitează genomul uman (el aproape lipseşte la vertebratele inferioare). Cu siguranţă el a avut si mai are efecte negative dar si pozitive. Foarte probabil însă aproape toate aceste repetiţii parazitice de ADN par vechi şi epuizate deoarece există puţine probe că ele îşi continuă reinserţia în prezent.

Rezultatele publicate de Consortiul International vizează şi alte domenii: analiza *proteomului*, istoria şi evoluţia genomului uman, aplicaţiile în medicină şi biologie. Ne vom referi succint la ultimul aspect. O aplicaţie esenţială a cercetării genomului uman o reprezintă abilitatea de a găsi gene cu funcţii biochimice necunoscute. Deasemeni, analiza secvenţei genomului uman a permis identificarea mecanismelor ce duc la sindroamele cu microdeleţii cromosomice (de ex. sdr. Velo-Cardio-Facial sau sdr Williams-Beuren) precum şi la

[12] L 5 ianuarie 2003 erau identificate şi localizate pe cromosomi 26148 de gene iar alte a48 nu erau încă localizate.

identificarea rapidă a genelor paraloge de boală, adică a unor gene înrudite care produc boli asemănătoare (de ex. genele pentru presenilina-1 şi presenilina-2 în care mutaţiile produc o formă de boală Alzheimer cu debut precoce. Aceasta va genera noi optiuni terapeutice.

În concluzie, publicarea primei schite a secvenţei genomului uman (februarie 2001) reprezintă un progres considerabil dar mai sunt încă multe de făcut până la finalizarea proiectului şi extragerea tuturor informaţiilor din cunoaşterea acestei secvenţe pentru a înţelege cum funcţionează genomul uman.

Vom menţiona în încheiere că se cunoaşte secvenţacompletă a ADN din cromosomii 20, 21 şi 22.

D. ORGANIZAREA ADN ÎN CELULĂ

1. APARATUL GENETIC

Structurile celulare care conţin ADN (nucleul şi mitocondriile), precum şi cele care intervin în realizarea funcţiilor sale (ribosomii şi centriolii) alcătuiesc **aparatul genetic.** Nucleul este elementul principal al aparatului genetic, centrul de comandă şi control al tuturor activităţilor celulare. El conţine circa 99.5 % din toată cantitatea de ADN a celulei.

Structura nucleului diferă în interfază şi diviziune, cele două etape importante ale ciclului de viaţă al celulei. Fără a intra acum în detalii (vezi capitolul 5.B.1) vom preciza că interfaza este alcătuită (figura 2.11) din: *faza G_1* – presintetică, în care cromosomii despiralizaţi sunt *monocromatidieni* şi au au o singură moleculă de ADN iar conţinutul total al ADN este *2C*; *faza S* – în care se produce sinteza ADN, prin replicare semiconservativă, şi cantitatea de ADN a celulei se dublează la *4C*; *faza G_2* – postsintetică, în care cromosomii sunt *bicromatidieni*, fiecare cromatidă fiind alcătuită dintr-o singură moleculă de ADN. Prin diviziunea (*mitoza*) se produce, prin disjuncţie (separare) cromatidiană, distribuţia (segregarea) egală şi totală a materialului genetic dublat în faza S.

Nucleul interfazic este delimitat la exterior de o *membrană dublă,* cu pori (prin care se realizează schimburile nucleo-citoplasmatice); în interiorul nucleului se află: un *nucleoschelet* sau matrice nucleară (formată din ARN şi proteine, în special actină), *cromatină, nucleoplasmă şi nucleol(i)* (cu rol esenţial în formarea ribosomilor).

În nucleu, fiecare moleculă de ADN se *asociază* cu pro teine histonice, nehistonice şi mici cantităţi de ARN, formând un complex nucleo-proteic numit **cromatină**. Interacţiunile dintre ADN şi proteine au un *rol structural* fundamental în organizarea supramoleculară a ADN, precum şi un *rol funcţional* în mecanismele complexe care reglează expresia şi replicarea genelor. Relaţiile complexe dintre ADN şi proteine nu sunt încă complet elucidate.

CASETA 2.2

Proteinele histonice şi nehistonice

Histonele *sunt proteine bazice prezente la toate eucariotele, cu mare afinitate pentru ADN, fixându-se pe mica incizură şi neutralizând sarcinile acide. Raportul ADN - histone este egal cu 1. Genele care codifică histone au o structură particulară (fără introni), se află în mai multe exemplare (peste 20), localizate pe cromosomii 1, 6, 12. Se exprimă în faza S a ciclului celular, sincron cu replicarea ADN. După numărul şi tipul de aminoacizi se deosebesc cinci tipuri de histone prezente la toate eucariotele:* ***H1, H2A, H2B, H3 şi H4****. Cu excepţia histonei H1, celelalte tipuri (şi mai ales H3 şi H4) au o structură stabilă, bine conservată în evoluţie. Acest lucru relevă rolul structural important pe care îl au aceste proteine în organizarea supramoleculară a ADN şi compactarea lui în nucleu. Ele intră în alcătuirea* ***nucleosomilor****, particule fundamentale din structura fibrelor de cromatină. Histonele au însă şi roluri funcţionale, fiind implicate în reglarea expresiei*

genelor (transcripţie): acetilarea histonelor determină activarea unor gene, iar metilarea lor produce represia genică. Fosforilarea histonei H1 provoacă condensarea fibrelor de cromatină interfazică în cromosomi şi declanşează mitoza. O dovadă recentă a rolului funcţional al histonelor este descoperirea histonei $H1^0$ (numită şi H5) care lipseşte în celulele care se divid şi apare în celulele diferenţiate sau celule în faza G_0. Au fost identificate şi alte variante funcţionale. Astfel histona H2AZ, cu rol important în reglarea transcripţiei, este o variantă larg răspândită la nivelul cromosomilor, dar neumiform. CENP-A este o proteină înrudită cu H3 care are rol major în activitate centromerilor.

***Proteinele nehistonice** sunt proteine acide şi neutre, numeroase, heterogene şi puţin abundente; o excepţie face grupul proteinelor HMG ("high mobility group"). Unele proteine nehistonice au un rol structural formând "matricea" cromosomilor dar majoritatea au roluri funcţionale, intervenind specific în reglarea sau modularea activităţii genelor. Ele se fixează la ADN în marea incizură laterală. Proteinele HMG participă probabil la reglarea replicării ADN.*

Moleculele de ADN şi histone suferă *spiralizări succesive*, alcătuind un sistem ierarhizat de **fibre de cromatină**, de dimensiuni diferite. Ele realizează *"compactarea"* moleculelor lungi de ADN în spaţiul nuclear, care nu depăşeşte câţiva microni în diametru.

La începutul diviziunii, membrana nucleară şi nucleolii dispar, iar fibrele de cromatină se spiralizează, se condensează şi formează **cromosomii**; la sfârşitul diviziunii aceştia se despiralizează şi persistă în interfază sub forma filamentelor de cromatină.Cromatina şi cromosomii sunt *două modalităţi diferite de organizare morfofuncţională* a materialului genetic, în interfază şi diviziune.

O dovadă elegantă a acestei afirmaţii o reprezintă *"fenomenul de condensare prematură a cromosomilor"*. El se realizează prin *fuzionarea experimentală* a unei celule în diviziune (metafază) cu o celulă interfazică (în faza G1, S sau G2). Se produce o "sincronizare" a celulei interfazice şi o condensare precoce a filamentelor fine de cromatină, care vor prezenta toate detaliile morfologiei cromosomilor, fiind monocromatidieni, dacă celula se află în G1 sau bicromatidieni dacă inducerea condensării s-a făcut în faza G2 (pentru celulele în faza S condensarea precoce determină un aspect "pulverizat" al cromatinei). De menţionat că prin tehnica condensării precoce a cromosomilor pot fi vizualizaţi şi analizaţi cromosomii gameţilor, celule interfazice.

2. CROMATINA

Asocierea obligatorie dintre ADN nuclear şi proteine se numeşte cromatină. În diferite stadii ale ciclului celular cromatina prezintă diferite grade de condensare şi se prezintă sub două tipuri morfo-funcţionale distincte: eucromatina şi heterocromatina (tabel 2.2)

Tabelul 2.2. Caracteristicile eucromatinei şi heterocromatinei.

Caracteristici	EUCROMATINA	HETEROCROMATINA
Condensare	Fin dispersată	Puternic condensată (cromocentri)
Colorare	Slabă	Intensă
Replicare în faza S	Precoce	Tardivă
Activitate genetică	Activă	Inactivă
Compoziţie chimică	Predomină p.b. C - G; ADN nerepetitiv; proteine nehistonice	Predomină p.b. A - T; ADN repetitiv; proteine histonice

2.1. EUCROMATINA ŞI HETEROCROMATINA

Eucromatina are mai mult ADN nerepetitiv, în care predomină perechile de baze G-C, şi proteine nehistonice; este puţin condensată şi reprezintă partea activă genetic (transcripţională)

a cromatinei; se replică precoce la începutul fazei S. Alcătuieşte benzile R pozitive din cromosomii cu marcaj în benzi.

Heterocromatina, are mai mult ADN repetitiv (în care predomină p.b. A-T) şi histone, este foarte compactată (condensată sub formă de *cromocentri*), inactivă genetic, cu replicare tardivă. Deşi inactivă genetic (transcripţional), heterocromatina îndeplineşte cu siguranţă *anumite funcţii celulare*. Se presupune că heterocromatina stabilizează centromerul şi telomerele cromosomului, intervine în desfăşurarea meiozei (în sinapsa cromosomilor omologi) şi, probabil, în diferenţierea celulară. Heterocromatina este de două feluri: constitutivă şi facultativă

- **Heterocromatină constitutivă** care se găseşte constant sub formă condensată. Ea nu conţine gene funcţionale, şi este formată din ADN înalt repetitive (ADN satelit). În structura cromosomului, heterocromatina constitutivă se află în regiunea centromerului, pe braţul lung al cromosomului Y, pe braţele scurte ale acrocentricilor şi în constricţiile secundare. Ea poate fi evidenţiată în cromosomii metafazici, printr-un tratament specific, sub forma unor benzi numite benzi C.
- **Heterocromatină facultativă** care diferă la celule diferite şi chiar la organisme diferite: în unele celule anumite gene sau părţi din cromosomi pot fi active; în alte celule, aceleaşi structuri pot să nu funcţioneze, fiind sub formă de heterocromatină. Astfel, **heterocromatinizarea** ar interveni în reglajul genic. Exemplul cel mai tipic îl constituie *cromatina sexuală*; unul din cei doi cromosomi X la organismele de sex feminin este inactivat formând **cromatina X**. Procesul se produce la întâmplare şi independent în fiecare celulă

2.2. CROMATINA SEXUALĂ

Cromatina sexuală reprezintă un cromocentru cu particularităţi morfologice bine definite, care permite stabilirea numărului de cromosomi sexuali şi, prin aceasta, *determinarea sexului genetic (XX sau XY) şi anomaliilor numerice ale cromosomilor sexuali.*

Cromatina sexuală se prezintă diferit la femeie şi la bărbat, deoarece rezultă prin mecanisme diferite.

- La femeie (XX), cromatina sexuală se formează prin *inactivarea unuia din cei doi cromosomi X,* care formează un corpuscul de heterocromatină numit **corpuscul Barr** sau cromatină X.
- La bărbat (XY) cromatina sexuală reprezintă *heterocromatina braţului lung* al cromosomului Y, care se vizualizează la microscopul în fluorescenţă prin afinitatea particulară pentru diferite substanţe fluorescente (în special quinacrină); de aceea se mai numeşte **corpusculul F** sau cromatina Y.

a). Cromatina X (Barr şi Bertram, 1949)

Aşa cum am precizat şi vom discuta ulterior în detaliu (vezi capitolul 4.B.4), cromatina X rezultă la femeile XX prin **inactivarea** unuia din cei doi cromosomi X, care prin condensare (heterocromatinizare) va forma corpusculul Barr. În felul acesta, atât la femeie cât şi la bărbat, va rămâne *numai un singur X rămâne funcţional*; la ambele sexe, toţi cromosomii X în plus vor fi heterocromatinizaţi. Potrivit **ipotezei Lyon** (1961), inactivarea cromosomului X este *totală*, se produce *precoce* în perioada embrionară şi este *definitivă*, pentru toată viaţa. Procesul de inactivare a unuia din cei doi cromsomi X (de origine maternă şi paternă) se produce la *întâmplare* şi *independent* în fiecare celulă.

Cromatina X, se poate evidenţia pe frotiuri realizate cu celulele diferitelor mucoase (de obicei mucoasa bucală), pe frotiuri de sânge (în polimorfonuclearele neutrofile), în bulbul pilos, în celule amniotice şi în celule obţinute prin biopsia diferitelor organe.

În *celulele epiteliale ale mucoasei bucale*, cromatina X se prezintă sub forma unui *corpuscul* (cromocentru) intens colorat bazofil, situat de obicei pe faţa internă a membranei nucleare, ovalar sau plan convex, cu mărime medie de un micron (±0.3), numit **corpusculul Barr** (figura 2.12.a). Prin caracteristicile sale el poate fi *deosebit* de nucleol sau alţi

cromocentri nespecifici. Teoretic, toţi nucleii celulelor provenite de la persoane normale de sex feminin ar trebui să aibă un corpuscul Barr. În practică, procentul celulelor "cromatin X pozitive" este cuprins între 15-35 % datorită: calităţii improprii pentru analiză a unor nuclei, şi probabil, acţiunii unor factori celulari care produc decondensarea cromosomului X fără a afecta însă inactivarea lui. *Numărul de corpusculi Barr este egal cu suma cromosomilor X - 1*. În felul acesta, pe baza numărului de corpusculi Barr se poate preciza numărul cromosomilor X şi diagnostica[13], simplu şi repede, sexul genetic şi diferite anomalii numerice: X0, XXX, XXY, etc. (figura 2.13).

În *polimorfonuclearele neutrofile* (PMN) cromatina X se poate prezenta sub forma unor **apendici nucleari**, fie "în băţ de tobă" (apendice tip A), fie ca un "nodul sesil" (apendice de tip B) (figura 2.12.b). Pentru un diagnostic corect ei trebuie deosebiţi de alţi apendici nesexuali. Numărul apendicilor sexuali este, ca şi în cazul corpusculului Barr, egal cu suma cromosomilor X minus 1.

b). Cromatina Y

În celule prelevate de la o persoană de sex masculin (XY) se poate evidenţia prin coloraţia cu diferiţi fluorocromi (quinacrină) şi examinare microscopică în lumină ultravioletă, un corpuscul intens fluorescent, numit **corpuscul F** (figura 2.12.c). El reprezintă aspectul interfazic al celor 2/3 distale a braţului lung al cromosomului Y, alcătuite din heterocromatină intens fluorescentă. Mărimea medie a corpuscului F este 0.25 microni, iar *numărul de corpusculi F este, firesc, egal cu numărul cromosomilor Y.*

2.3. STRUCTURA SUPRAMOLECULARĂ A CROMATINEI

Analiza cromatinei la microscopul electronic evidenţiază un *sistem ierarhizat de fibre de cromatină,* de dimensiuni diferite (figura 2.14), alcătuite din ADN, histone şi proteine nehistonice.

Primul nivel de organizare supramoleculară a ADN este **filamentul cu nucleosomi**, cu diametrul de 10 nanometri (nm). **Nucleosomul** este alcătuit dintr-un complex de ADN şi histone (figura 2.15.a): o secvenţă de ADN (de 146 p.b.) se înfăşoară (1 tur şi 3/4) în jurul unui "miez" histonic, cilindric, formată din 8 molecule de histone (câte 2 molecule din H2A, H2B, H3 şi H4). Nucleosomii sunt legaţi între ei printr-un *segment de ADN liber* (60 p.b.), formând filamentul cu nucleosomi, asemănător unui *"şirag de mărgele".* Această structură (menţinută strâns prin histona H1, ce leagă doi nucleosomi vecini) realizează o rată de "împachetare" a ADN nativ (dublu helix de 2nm) de circa 10:1.

> Mecanismul prin care se formează nucleosomii este încă puţin cunoscut. Cert este faptul că nucleosomii nu sunt structuri statice, rigide, deoarece funcţiile ADN (transcripţia, replicarea, recombinarea) necesită separarea celor două catene ale ADN şi implicit modificarea structurii nucleosomului. Ei sunt fixaţi la o singură catenă a ADN ("în fază") aceiaşi de la o celulă la alta.

Al doilea nivel de organizare supramoleculară a cromatinei este **fibra de cromatină de 30 nm.** Ea rezultă din spiralizarea în solenoid a filamentului cu nucleosomi (figurile 2.14 şi 2.15.b). Această structură (cu pasul de 6 nucleosomi) este stabilizată de histona H1 şi realizează o compactare de 5:1. Fibra de cromatină de 30 nm este unitatea fundamentală de organizarea cromatinei în nucleul interfazic.

> Fibra de cromatină are însă şi un rol important pentru *funcţionarea genomului,* deoarece prin spiralizare apropie mult diferite regiuni ale ADN care, liniar, se află la distanţe mari unele de altele. În felul acesta, favorizează *interacţiunile genice* necesare pentru expresia adecvată a informaţiei ereditare. Mai mult, solenoidul *nu are o structură omogenă*: zonele spiralizate *alternează neregulat* cu zone nespiralizate, unde se pot fixa o serie de proteine specifice, care produc o configuraţie cromatiniană ce permite accesul ARN polimerazei şi deci transcripţia.

[13] În laboratoarele cu dotari pentru FISH se folosesc sonde marcate fluorescent pentru X si Y care permit evaluarea mai precisă a prezentei si numărului cromosomilor sexuali în nucleii interfazici.

Al treilea nivel de organizare rezultă prin *plierea* fibrei de cromatină de 30 nm în *bucle laterale*, numite şi domenii, de lungimi diferite (20-100 kb); se formează **fibra pliată în bucle laterale** cu un diametru de 300 nm (grad de compactare 10:1). Buclele sunt *ataşate,* prin anumite *situsuri de ancorare*[14] din structura fibrei de ADN, la un *"schelet" sau matrice proteică* (nonhistonică[15]) (figura 2.14), care are o formă identică cu cea a cromosomului metafazic**.** Se consideră că fiecare buclă sau domeniu (ce conţine câteva gene) ar putea fi *o unitate funcţională de transcripţie şi replicaţie*; buclele au deci atât o semnificaţie structurală cât şi un rol funcţional important.

Fibra pliată în bucle laterală formează *la începutul profazei*, printr-o puternică spiralizare şi condensare (grad compactare 20), **cromatida** unui cromosom (figura 2.14). Ea atinge în metafază o grosime de 700 nm, fiind cel mai înalt grad de compactare a fibrei de bază a cromatinei (30 nm). Fiecare cromatidă a unui cromosom conţine deci *o singură moleculă de ADN*, organizată în mai multe structuri succesive şi ierarhizate de "împachetare". La sfârşitul diviziunii, *în telofază,* se produce despiralizarea/decondensarea cromosomilor.

Relaţia dintre ADN, fibrele de cromatină şi cromosomi se poate reda sintetic astfel:

ADN	→	FILAMENT CU NUCLEOSOMI	→	F I B R A DE CROMATINĂ	→ F I B R A P L I A T Ă Î N BUCLE	→ **CROMATIDA UNUI CROMOSOM**
				INTERFAZA		*DIVIZIUNE*

Molecula de ADN suferă astfel o *compactare de 10.000 de ori* şi poate încape facil în spaţiul mic, de câţiva microni, al nucleului. Acest fenomen *favorizează distribuţia corectă a materialului genetic* în diviziune şi asigură funcţionarea ADN.

Înainte de a încheia prezentarea acestor fenomene vom sublinia un alt fapt important. Buclele fibrei de 300 nm *se fixează neregulat* de scheletul proteic. Din loc în loc (în regiuni de ADN în care predomină secvenţe cu p.b. A-T) ele formează *mici aglomerări de bucle,* numite **cromomere**, separate prin zone mai laxe (figura 2.16)**.** Pe măsură ce cromosomul profazic se condesează cromomerele mici, vecine, se unesc într-o structură mai mare. Aceste cromomere mari se adună în grămezi şi formează benzi intens condensate şi colorate (benzi G); ele vor fi separate prin benzi mai puţin condensate şi mai clare (benzi R).

ADN care formează benzile G (sau Q) conţine mai multe puncte de ataşare, strâns apropiate, iar buclele sunt mai dense, mai compactate; coloranţii (Giemsa, Quinacrină) care au afinitate pentru regiunile SAR bogate în A-T vor da benzi G. In benzile R densitatea punctelor de ataşare este mai mică, buclele sunt mai laxe.

Benzile cromosomice reflectă *structura internă heterogenă* a cromosomului şi definesc *regiuni din genom care au proprietăţi şi funcţii diferite* .

3. CROMOSOMII UMANI

La începutul diviziunii cromatina se organizează în **cromosomi,** organite nucleare care fixează intens coloranţii bazici ("chroma" - culoare; "soma" - corp) şi îndeplinesc două funcţii importante: *transportă materialul genetic* de la părinţi (prin gameţi) la descendenţi, precum şi de la o celulă "mamă" la celulele "fiice" în cursul multiplicării celulare, asigurând *stabilitatea* proceselor ereditare; realizează *amestecul materialului ereditar* între generaţii succesive, prin procesele de recombinare ce au loc în meioză, sursa principală de variabilitate

[14] "Regiunile de ataşare la matrice" (prescurtarea în engleză, SAR) sunt bogate în AT

[15] Printre proteinele matricei se află şi *topoisomeraza II* care are un rol esenţial pentru condensarea cromosomilor.

Anomaliile de număr şi structură ale cromosomilor sunt implicate în numeroase stări patologice (vezi capitolul 10) şi deaceea explorările citogenetice reprezintă o *metodă importantă de diagnostic* în medicina clinică (sindroame plurimalformative, debilităţi mintale şi tulburări de comportament, tulburări de sexualizare şi reproducere, cancer). Orice medic practician trebuie să aibă cunoştinţe precise despre metodele de studiu, indicaţiile şi limitele analizei cromosomice precum şi priceperea de a interpreta corect rezultatele explorărilor citogenetice.

3.1. MORFOLOGIA CROMOSOMILOR UMANI

Numărul şi morfologia cromosomilor sunt elemente caracteristice pentru fiecare specie. La om, în celulele somatice diploide, există în mod normal 46 de cromosomi, iar în gameţi (celule haploide) doar 23 de cromosomi. După fecundare, la zigot, se reface numărul diploid şi se realizează 23 perechi de **cromosomi omologi**, identici ca mărime, formă şi conţinut genic[16] - dar diferiţi ca origine. 22 perechi de cromosomi sunt identice la cele două sexe şi se numesc **autosomi**; o pereche diferă însă la cele două sexe, numindu-se cromosomi sexuali sau **gonosomi**: XX la femeie şi XY la bărbat. Cromosomii X şi Y sunt omologi doar ca origine şi funcţie, ambii având un rol important în determinismul sexelor; ei se deosebesc morfologic (cromosomul Y fiind mult mai mic decât cromosomul X) şi genetic (cromosomul X are şi gene "nesexuale" ce determină diferite caractere ale corpului).

Cromosomii sunt cel mai uşor de analizat în stadiul de *metafază sau prometafază* al mitozei **(**figura 2.17**)** deoarece se află în acelaşi plan (în "placa ecuatorială") şi sunt bine individualizaţi. În aceste stadii ei sunt alcătuiţi din *două cromatide unite la centromer şi delimitate la capete prin telomere* (figura 2.18 a). Cromosomii sunt bicromatidieni deoarece în faza S a ciclului celular a avut loc dublarea (replicarea) materialului genetic.

a). Elementele morfologiceşi funcţionale comune tuturor cromosomilor sunt: cromatidele, centromerul şi telomerele. Ele sunt *esenţiale* pentru replicarea şi distribuţia cromosomilor în diviziune; de aceea ele nu pot lipsi din structura unui cromosom funţional sau din arhitectura cromosomilor "artificiali" (YAC) care au început să fie "fabricaţi" în scopuri experimentale.

(1). Cromatidele unui cromosom sunt subunităţi longitudinale identice (*"cromatide surori"*) care posedă fiecare *o singură moleculă de ADN* asociată cu proteine sau, mai exact, o fibră de cromatină puternic condensată (figura 2.14). În lungul cromatidelor există, foarte probabi,l *secvenţe de replicare autonomă* (elemente ARS), bogate în AT, în care se *iniţiază* replicarea. Localizarea lor nu a fost încă precis definită la om.

(2). Centromerul este locul în care cromatidele surori sunt ataşate prin intermediul unor proteine, formând *constricţia primară.* Cromosomii au în mod normal *un singur centromer*. Poziţia centromerului la fiecare cromosom este *fixă, fiind determinată* de o secvenţă particulară de *ADN centromeric* înalt repetitiv (ADN satelit)*, aceiaşi* la toţi cromosomii; ea formează un bloc de heterocromatină constitutivă, evidenţiat prin marcajul C. La aceasta secvenţă de ADN comună tuturor cromosomilor se poate adăuga o *secvenţă specifică fiecărui cromosom* (ADN alfoid). La secven'ele centromerice se leagă nişte proteine specifice CENP (A, B, C, D) care sunt probabil implicate în funcţiile centromerului.

Centromerul împarte cromatidele în două *braţe*, notate convenţional cu p (de la *"petit"*) pentru braţul scurt şi q (de la *"qeue"*), pentru braţul lung. După poziţia centromerului, cromosomii pot fi:

- *metacentrici* (cu centromerul în la mijlocul cromosomului şi braţele aproximativ egale),
- *submetacentrici* (cu centromerul în afara zonei centrale şi braţele de lungimi diferite),
- *acrocentrici* (cu centromerul spre un capăt al cromosomului). (figura 2.18 b)

Centromerul are un rol cheie în *diviziunea celulară,* în procesul de segregare. Funcţia centromerului este de a asigura distribuţia *egală* a fiecărui cromosom, prin mitoză de la celula

[16] Cromosomii omologi au aceleaşi tipuri de gene (loci omologi), în aceeaşi ordine dar în acelaşi locus ei pot avea forme identice sau diferite ale genelor alele.

"mamă" la "celulele fiice". În acest proces, ADN centromeric determină fixarea specifică a unor proteine[17] care vor forma *kinetocorii*, locul de fixare a microtubulilor filamentelor fusului de diviziune (în metafază), care vor asigura tracţiunea şi deplasarea cromatidelor la polii fusului de diviziune (vezi capiolul 5.B.2). Fragmentele cromsomice fără centromer ("*acentrice*")[18] nu se ataşează la fusul mitotic şi nu vor fi incluse în nucleii celulelor fiice iar *cromosomi dicentrici* anormali nu se pot "distribui" corect în diviziune.

> Recent s-a stabilit că *alipirea* celor două cromatide la nivelul centromerului este controlată de *proteina ISS* (de la *Inhibitor of Sister chromatid Separation*). Atunci când cromosomii s-au *aliniat corect* în placa metafazică o enzimă (*ubiquitina*) produce degradarea bruscă a proteinei ISS şi începe anafaza, cu migrarea cromatidelor surori spre fiecare pol. În absenţa centromerului se pierde controlul distribuţiei cromosomilor în celulele fiice; una din ele poate primi două copii ale cromosomilor acentrici se formează de obicei în celule tumorale o structură numită "*double minute chromosomes"*

(3). **Telomerele** - sunt structuri specializate formate din ADN şi proteine care acoperă capetele cromosomului. Ele prezintă *un bloc* (3-20 kb) de ADN repetitiv format din secvenţe scurte de (5'-TTAGGG-3'), repetate în tandem, de câteva mii de ori; ele sunt identice la toţi cromosomii şi perfect conservate în evoluţie. Sub acest bloc se găseşte regiunea subtelomerică (TAR de la *telomere associated* repeats, divizată în două domenii) formată din ADN repetitiv, cu funcţiie încă necunoscute, dar cu o structura 95% identică la alţi cromosomi. Urmează secvenţe de ADN specifice fiecărui cromosom

Telomerele au următoarele funcţii probabile:

- *Menţinerea stabilităţii şi integrităţii structurală a cromosomului,* apără capetele cromosomilor de degradare şi împiedică fuziunea *"cap la cap"* cu alţi cromosomi; pierderea telomerelor produce capete cromosomice instabile care au tendinţa de a fuziona cu capetele altor cromosomi rupţi, formînd diferite tipuri de aberaţii structurale.

  > Recent s-a stabilit că prezenţa telomerelor la capetele cromosomilor serveşte ca *semnal* de normalitate; dacă în celulă se produce o ruptură cromosomică şi apare un fragment cromosomic această structură anormală este recunoscută de mecanismele de control ale integrităţii ADN şi se produce oprirea temporară a ciclului celular, pentru a permite repararea leziunilor; dacă acest lucru nu este posibil atunci se declanşează apoptoza

- *Asigurarea replicării complete a capetelor cromosomului*. Procesul se realizează cu ajutorul unei *telomeraze*; reducerea activităţii sale produce o pierdere treptată a secvenţelor telomerice, la fiecare replicare; acest fenomen (ce va fi descris în detaliu în capitolul 5) va duce la *scurtarea progresivă a telomerelor*, până la un moment critic ce va bloca diviziunea celulei. Aceasta ar putea fi o explicaţie a duratei limitate de viaţă a celulelor somatice. Aşa cum vom vedea, fenomenul de scurtare a telomerelor este implicat în *senescenţă şi cancer* (Holt, 1996).
- Participare la stabilirea *arhitecturii tridimensionale a nucleului* (cromosomii se fixează cu telomerele pe faţa internă a membranei) *şi/sau* la iniţierea *sinapsei corecte a cromosomilor omologi* la începutul profazei meiozei I.

b). Elemente morfologice comune *unor* cromosomi.

(1). Sateliţii. Cromosomii acrocentrici (exceptând Y) au ataşate la braţele scurte, mici mase de cromatină numite *sateliţi*. Ataşarea sateliţilor se face prin intermediul unor filamente ce conţin genele pentru ARN ribosomal (bogat reprezentat în nucleol); de aceea ele se numesc şi *organizatori nucleolari*.

(2). Constricţiile secundare (notate convenţional cu "h") se găsesc pe cromosomii 1, 9 şi 16, pe braţul lung lângă centromer. Sunt alcătuite din ADN repetitiv.

---

[17] Mutaţii ale genelor pentru proteinele centromerice perturbă formarea kinetocorilor şi pot determina *nedisjuncţie sau întârziere anafazică*

[18] Fragmnetele acentrice sunt rezultatul unor rupturi cromosomice spontane sau induse de factori mutageni

(3). **Situsurile fragile**. Uneori pe cromatidele cromosomilor se observă nişte "lacune" necolorate în care cromosomii *se pot rupe* mai uşor, *in vivo* sau în anumite condiţii de cultură (folosirea unor antifolaţi sau aphidicolin, un inhibitor specific al ADN polimerazei). Aceste zone de rezistenţă scăzută, situate într-un punct specific în lungul cromosomului, se numesc *situsuri fragile*. Majoritatea situsurilor fragile sunt considerate markeri normali. Excepţie face un situs fragil *FRAXA* situat pe braţul lung al cromosomului X (*Xq27*), asociat frecvent cu debilitate mintală (*sindromul X fragil*). Studii recente sugerează că unele situsuri ar putea avea un rol în progresia tumorală: rupturile în aceste situsuri produc inactivarea unor gene supresoare de tumori.

c). Benzile cromosomice, elemente specifice fiecărui cromosom

Prin diferite tratamente (digestie enzimatică, denaturare termică etc) şi/sau încorporarea unor coloranţi specifici pentru ADN (Giemsa, Quinacrină etc), cromosomii metafazici apar alcătuiţi dintr-o *serie continuă de benzi longitudinale*, în care zone intens colorate (benzi G) *alternează regulat* cu altele mai slab colorate (benzi R). Fiecare cromosom are *un model caracteristic al poziţiei, succesiunii, mărimii şi intensităţii benzilor*, ce permite identificarea sa precisă **(**figura 2.19**)**. Acest model este *identic* în toate celulele corpului şi la toţi indivizii speciei[19]. Mărimea benzilor este cuprinsă între 1-10 Mb.

Benzile sunt markeri citologici ai *structurii interne heterogene* a cromosomilor; ele reflectă în primul rând gradul de compactare (condensare) a fibrei de cromatină în lungul cromosomilor; Benzile se corelează în mare măsură şi cu organizarea funcţională a cromosomilor, deoarece definesc *o distribuţie alternativă a eucromatinei (benzi R) şi heterocromatinei (benzi G),* care posedă proprietăţi diferite (tabelul 2.3)

- **Benzile G şi Q** sunt zone din cromosomi bogate în *heterocromatină,* mai compactate, ce conţin puţine gene active şi se replică tardiv spre sfârşitul fazei S; ele posedă ADN bogat în A-T (55-60%) şi numeroase secvenţe repetitive LINES.
- **Benzile R** sunt arii cromosomice ce conţin *eucromatină*, puţin condensată, cu o mare densitate de gene structurale, active; ADN lor se replică precoce, la începutul fazei S şi este bogat în perechi de baze G-C (60%), cu numeroase secvenţe repetitive SINES (în special din familia ALU). De aceea anomaliile cromosomice care implică benzile R au consecinţe clinice importante.
- **Benzile C**, situate în regiunea centromerică, sunt alcătuite din *heterocromatină constitutivă*. Aceasta se mai găseşte pe braţul lung al cromosomului Y, constricţiile secundare şi sateliţii cromosomilor acrocentrici. Deoarece heterocromatina este lipsită de gene sau genele sunt inactive, modificări structurale în aceste zone nu produc efecte fenotipice.

Tabelul 2.3 Caracteristicile benzilor comosomice

(modificat după Miller O.J., 1996)

Caracteristici	Benzi - R	Benzi - Q sau G	Benzi - C
Localizare	Braţe cromosomice	Braţe cromosomice	Centromere, Yq
Tip de cromatină	Eucromatină	Heterocromatină	Heterocromatină
Tip secvenţe ADN	Unice, unele repetitive	Repetitive, unele unice	Înalt repetitive - ADN satelit
Compotiţia bazelor	Bogate în GC	Bogate în AT	Bogate în AT, unele în GC
Secvenţe repetitive	SINEs	LINEs	ADN satelit
Replicare	Precoce	La mijloc sau sfîrşit S	Tardivă
Transcripţie	Intensă	Redusă	Absentă
Densitate gene Insule bogate în CpG	Numeroase	Puţine	Absente
Tip de gene	Gene comune	Gene specific-tisulare	Absente

3.2.TEHNICI DE ANALIZĂ A CROMOSOMILOR

a). Metode de obţinere a cromosomilor.

[19] Există doar câteva benzi care nu au o morfologie constantă la toţi indivizii..

Analizele citogenetice se pot realiza pe *cromosomii metafazici sau prometafazici,* obţinuţi din celule care se divid rapid în culturi celulare (limfocite, fibroblaste, celule fetale etc) sau, în unele cazuri, direct din ţesuturi cu activitate mitotică intensă (măduvă osoasă, trofoblast, tumori).

(1). **Metodele citogenetice de rutină** folosesc *culturi de limfocite din sângele periferic* (produsul cel mai accesibil pentru studiu).

O probă de 0.5 ml sânge heparinat (recoltată steril) este incubată 48-72 ore (la 37º) într-un *mediu* nutritiv, la care se adaugă ser uman sau de viţel (pentru a îmbogăţi conţinutul în proteine şi factori de creştere) şi *fitohemaglutinină* (pentru a stimula multiplicarea limfocitelor T). Cu puţin timp înainte de terminarea culturii, mitozele sunt *blocate în metafază cu colchicină*, substanţă ce inhibă formarea fusului de diviziune şi trecerea în anafază. Apoi, mediul este înlocuit cu o *soluţie salină hipotonă,* care "umflă" celulele şi dispersează cromosomii; Urmează *fixarea* celulelor, *etalarea* lor pe o lama microscopică şi *colorarea (cu Giemsa).* Preparatele sunt examinate la microscop, se numără cromosomii (obişnuit 16 metafaze; 32 în cazul suspiciunii unui mozaic cromosomic) şi se analizează morfologia lor; metafazele selecţionate sunt fotografiate. Cromosomii, din fotografiile obţinute după mărire, sunt *decupaţi, identificaţi* şi apoi aranjaţi în **cariotip**, pe baza criteriilor morfologice, în perechi de omologi şi grupe. Se analizează atent morfologia şi modelul în benzi a fiecărui cromosom. Tehnica de analiză cromosomică este *o metodă laborioasă, complexă şi costisitoare*, necesitând o pregătire şi o dotare specială. În condiţii obişnuite, un rezultat complet nu poate fi obţinut decât în 1-2 săptămâni. Există însă şi sisteme de analiză computerizată a metafazelor care furnizează rapid şi corect cariotipul celulelor analizate; sunt însă scumpe şi necesită un dialog permanent "om -maşină".

(2). Metodele speciale folosesc *culturi* din alte tipuri celulare: *măduvă osoasă; fibroblaste* obţinute prin biopsie de piele; *celule fetale* recoltate prin amniocenteză sau biopsie de trofoblast (placentocenteză); ele au dezavantajul prelevării mai dificile şi a unui timp mai lung de cultură. Există deasemeni *variante tehnice* ce permit studiul cromosomilor în prometafază, evidenţierea situsurilor fragile[20] sau a sindroamelor cu rupturi cromosomice

(3) Metodele directe (fără cultură) se aplică, în anumite situaţii, ţesuturilor ce se divid activ: *măduvă osoasă* în leucemii; *tumori solide*; *vilozităţi coriale*, în diagnosticul prenatal. Aceste metode dau rezultate rapide (3-12 ore) dar numărul metafazelor analizabile este variabil şi calitatea cromosomilor mediocră. Metodele directe se pot folosi şi pentru studiul *cromosomilor meiotici*, mai ales din spermatocite, la bărbat.

b). Tehnici de analiză cromosomică.

Din 1956 şi până în prezent tehnicile de analiză cromosomică au evoluat permanent, putându-se deosebi schematic patru generaţii de tehnici.

(1) Tehnicile de generaţia I-a (1956). Cromosomii obţinuţi prin metodele prezentate mai sus şi *fără alt tratament* sunt *uniform coloraţi* (*"solid staining"*) şi au puţine repere pentru identificarea lor precisă (figura 2.20 a). Folosirea actuală a metodelor ce colorează uniform cromosomii este *limtată* la diagnosticul aneuploidiilor şi mozaicurilor cromosomice, investigarea situsurilor fragile, a rupturilor cromosomice şi polimorfismului cromosomic.

(2) Tehnicile de generaţia II-a (1970) sunt *tehnici de marcaj cromosomic în benzi a cromosomilor metafazici.* Folosind o serie de tratamente şi/sau coloraţii speciale a ADN se vizualizează pe cromosomii metafazici o structură specifică de benzi alternative intens colorate şi puţin colorate. Se evidenţiază astfel **300-400 benzi** pentru un set haploid de cromosomi metafazici. Aceste tehnici permit *identificarea precisă a fiecărui cromosom* (figura 2.20 b) şi caracterizarea majorităţii anomaliilor cromosomice (exceptând microdeleţiile).

Marcajul G se obţine prin *digestie controlată cu tripsină*, urmată de colorarea cu Giemsa. Tehnica este relativ simplă şi larg folosită; are dezavantajul că nu colorează telomerele cromosomilor (figura 2.21)
Marcajul Q se obţine prin colorarea cromosomilor cu un fluorocrom ce se fixează preferenţial pe regiunile ADN bogate în AT (ex. Quinacrina, DAPI, Hoechst 33258); benzile Q fluorescente (observabile în UV) au aceiaşi distribuţie ca şi benzile G. Metoda are dezavantajul că preparatele nu sunt permanente şi necesită un echipament special de microscopie. Este utilă în special pentru analiza cromosomului Y.
Marcajul R (de la *"Reverse"*) are o dispoziţie *inversă* benzilor G şi poate fi obţinut prin denaturarea

[20] **Situsurile fragile** se evidenţiază în culturi realizate într-un mediu fără ser uman sau tratate special cu inhibitori ai timidinsintetazei (substanţe antifolice).

termică controlată (85º) a preparatelor într-o soluţie salină, înaintea colorării cu Giemsa sau prin folosirea unor coloranţi specifici pentru regiunile bogate în GC (ex., *chromomicina A3*); benzile colorate se numesc benzi R (ele corespund benzilor G sau Q negative). Un subset de benzi R este reprezentat de **marcajul T** în care capetele cromosomilor apar intens colorate. Realizează o foarte bună diferenţiere a benzilor şi telomerelor, dar este laborioasă şi influenţată de o serie de factori ce trebuie bine cunoscuţi şi standardizaţi. (figura 2.22)

Marcajul C evidenţiază heterocromatina Constitutivă, în special la nivel centromeric; se obţine după denaturarea cu o soluţie saturată de hidroxid de bariu, înainte de colorarea cu Giemsa.

Alte metode (NOR, pentru evidenţierea regiunilor organizatoare de nucleoli; studiul replicării, în special a cromosomilor X, cu ajutorul bromodeoxiuridinei) etc. - sunt tehnici foarte speciale, utilizate doar pentru caracterizarea unor remanieri cromosomice complexe.

Unele tehnici de marcaj (R şi G) sunt folosite curent pentru analiza morfologiei cromosomilor, producând setul complet de benzi; alte tehnici (benzi Q, C, T, metodele de marcaj al replicării cu BrdU, coloraţia NOR,ş.a.) se folosesc în analiză numai în anumite situaţii, pentru a defini mai bine anumite subseturi de benzi precum şi tipul de aberaţii structurale ale cromosomilor.

(3) Tehnicile de generaţia III-a (1977) sunt *tehnici de marcaj de înaltă rezoluţie* care studiază cromosomii în primele faze ale diviziunii, când ei sunt mai puţin condensaţi. Fiecare bandă din cromosomii metafazici poate fi astfel subdivizată în mai multe sub benzi (figura 2.23). Se pot identifica **550 sau 850 de benzi,** corespunzător prometafazei sau profazei. Fiecare bandă corespunde probabil la 20-30 de gene, aceasta fiind limita maximă de rezoluţie în analiza citogenetică convenţională. Aceste tehnici permit evidenţierea unor modificări mici (de ex. microdeleţii) din structura cromosomilor.

Marcajul de înaltă rezoluţie se obţine prin folosirea tehnicilor de marcaj G sau R pentru procesarea cromosomilor aflaţi *în primele faze ale diviziunii* (prometafază, profază). Aceasta necesită *blocarea sintezei de ADN*, pentru *sincronizarea* tuturor celulelor şi, apoi, reluarea sintezei şi oprirea culturii într-un moment în care numeroase celule se află la sfârşitul profazei. Datorită complexităţii lor tehnicile de înaltă rezoluţie nu sunt proceduri de rutină. Se folosesc atunci când se suspectează o anomalie structurală fină (de ex. microdeleţia unei părţi dintr-o bandă cromosomică).

(4) Tehnicile de generaţia IV-a (1991) sunt **tehnici de citogenetica moleculară**. Ele folosesc "sonde" de *ADN monocatenar*, specifice unei anumit cromosom, regiuni cromosomice (centromer sau telomere) sau unor gene cu localizare cunoscută în anumite zone. Sondele *se fixează (hibridizează) prin complementaritate* în aceste situsuri "ţintă". Pentru a fi evidenţiate după hibridizare, sondele sunt 'marcate' cu un fluorocrom (vizibil la microscopul cu lumină UV). De aceea metoda se numeşte *hibridizare fluorescentă in situ* sau, prescurtat, **FISH** (de la Fluorescence In Situ Hybridization). (caseta 2.3)

FISH este o metodă performantă (rezoluţia pe cromosomi metafazici este de *câteva megabaze)* dar dificilă şi scumpă. Ea are indicaţii precise şi nu se substituie celorlalte tehnici citogenetice. Se foloseşte pentru: suspiciunea clinică / citogenetică a unei microdeleţii (figura 2.24.a şi b) sau microduplicaţii, a unor translocaţii criptice sau deleţii telomerice; detecţia sexului genetic sau a unor aneuploidii în *nucleii interfazici* (FISH “interfazic”; figura 2.24.c), mai ales din celulele fetale (diagnostic prenatal); caracterizarea unor remanieri complexe sau a unor cromosomi markeri, mai ales în celulele tumorale; detectarea unor secvenţe de Y la bărbaţii XX; evaluarea unui mozaicism.

3.3. CLASIFICAREA ŞI NOMENCLATURA CROMOSOMILOR UMANI

Identificarea cromosomilor umani se face pe baza morfologiei lor, utilizând criterii precis codificate la diferite conferinţe internaţionale de standardizare. Clasificarea actuală utilizează *"International System of Human Cytogenetic Nomenclature*" (ISCN)(1995)

Pe baza lungimii şi poziţiei centromerului cromosomii umani au fost clasificaţi în 7 grupe, notate (convenţional) de la A la G (tabel 2.4). Autosomii sunt desemnaţi fiecare printr-un număr de la 1 la 22. Se obţine astfel, o *aranjare sistematizată a cromosomilor unei celule numită* **cariotip** (figura 2.21 şi 2.22).

Tabel 2.4 Clasificarea pe grupe a cromosomilor umni

CROMOSOMI	Metacentrici	Submetacentrici	Acrocentrici
mari	**A** (1-3)*	**B** (4-5)	-
mijlocii	**E** (16)	**C** (6-12,X)	**D** (13-15)
mici	**F** (19-20)	**E** (17-18)	**G** (21-22,Y)

* Cromosomul 2 este mai submetacentric.

CASETA 2.3.

Hibridizarea fluorescentă in situ (FISH)

Principiul acestei metode de *citogenetică moleculară* este hibridizarea prin complementaritate, a unei sonde de ADN monocatenar (de circa 40 kb) cu o anumită regiune a unui cromosom. Sonda ADN este marcată fie *direct* prin încorporarea unui nucleotid-fluorescent, fie *indirect* prin încorporarea unui nucleotid modificat ce conţine o moleculă *"reporter"* (cum ar fi biotina sau digoxigenina) care este recunoscută de un ligand specific (streptavidina pentru biotină şi anticorpi specifici pentru digoxigenină) conjugat cu un flourocrom.

Sondele pot fi clasificate în 4 tipuri, în funcţie de aplicaţia practică:

- *Sonde specifice unui locus dat,* pentru detectarea deleţiilor sau duplicaţiilor submicroscopice; dacă sonda NU se fixează pe zona cromosomică căreia îi corespunde (absenţa semnalului colorat), atunci se poate concluziona deleţia (pierderea) acestei zone; apariţia a două semnale indică o microduplicaţie. Astfel, se pot decela anomalii segmentare foarte mici, la limita de rezoluţie a microscopului optic. Acest tip de sonde se folosesc şi pentru stabilirea precisă a punctelor de ruptură în cazul translocaţiilor.
- *Sonde centromerice* (alfoide) pentru identificarea centromerului unui anumit cromosom; pot fi utilizate în nucleii interfazici sau pe cromosomii metafazici
- *Sonde telomerice*.
- *Sonde specifice unui cromosom* permit "colorarea" particulară a unui /unor cromosomi (*chromosome painting*); "pictura cromosomică" poate evidenţia remanieri cromosomice mici; în acest grup se includ şi sondele corespunzătoare ADN genomic, folosite în *hibridizarea genomică comparativă.*

Ţintele sunt multiple:

- ADN din *cromosomii metafazici*; nivelul de rezoluţie este de ordinul a 1-3 Mb
- ADN din *nucleii interfazici ai celulelor fetale*; hibridizarea unor sonde de ADN specifice anumitor cromosomi (de ex. 21, 18, 13, X şi Y) cu *nuclei interfazici* permite diagnosticul prenatal rapid (fără cultură) al unor anomalii de număr ale cromosomilor respectivi, fără să fie nevoie de efectuarea cariotipului (ex. trei spoturi fluorescente obţinute cu sonda pentru cromosomul 21 pune diagnosticul de trisomie 21); nivelul de rezoluţie este de ordinul 100 Kb.
- *Molecule de ADN prealabil "alungite"* prin procedee fizice sau chimice; această metodă permite individualizarea a două sonde distanţate la 1 Kb.
- *Întregul cromosom.* Prin folosirea unui amestec de secvenţe ce corespund diferitelor părţi dintr-un anumit cromosom se poate obţine colorarea sa integrală cu un anumit fluorocrom ("chromosome painting"). Metoda a fost ulterior dezvoltată: folosind sonde cu secvenţe din fiecare cromosom, o combinaţie de mai mulţi fluorocromi (Multiplex FISH) şi analiza digitală automată a imaginilor (cu o cameră CCD) este posibilă colorarea diferită a fiecărui cromosom din cariotip. O variantă a acestei metode este *cariotiparea spectrală (SKY)* ce utilizează combinaţii variate a cinci probe fluorescente, o cameră specială de luat imagini şi un soft de procesare a imaginilor ce permite ca fiecare cromosom să aibe o coloraţie particulară, unică, ce face posibilă detectarea oricărui rearanjament cromosomic.
- *Întregul genom.* O metodă larg folosită în studiile citogenetice în cancer este *Hibridizara Genomică Comparativă (CGH)*: ADN test (de ex., tumoral) este marcat cu un fluorocrom verde iar ADN normal (control) cu unul roşu; cele două probe, amestecate, sunt hibridizate cu cromosomi metafazici normali. Raportul semnalului verde sau roşu pe cromosomii metafazici hibridizati indică localizarea unei duplicaţii (exces de verde) sau deleţii (exces de roşu) din ADN test

Identificarea precisă a cromosomilor în cadrul fiecărei grupe nu este posibilă fără ajutorul marcajului în benzi. Un exemplu edificator este prezentat în figura 2.20 în care se observă că fără marcajul benzii este imposibil de făcut deosebirea între cromosomii grupei D (13-14-15); acest lucru devine facil prin tehnicile de marcaj, fiecare cromosom având o distribuţie specifică a benzilor. Modelul de marcaj în benzi a tuturor cromosomilor umani şi nomenclatura lor este prezentat în figurile 2.25 şi 2.26.

La cromosomii cu marcaj, în lungul cromatidelor există diferite "*repere specifice*" (centromerul, unele benzi mai importante, telomerele) care împart fiecare braţ în *regiuni cromosomice*, numerotate pentru fiecare braţ, de la centromer spre telomere (p1, p2, p3…şi q1, q2, q3…); ele sunt divizate în mai multe *benzi*: p11 (unu-unu, nu unsprezece), p12, p13.. (fig. 2.21). Dacă prin tehnici mai fine (prometafază) banda este divizată în s*ub-benzi*, ele sunt numerotate ca sub-seturi ale benzii originale (de ex. banda 18 q22 poate fi divizată în 18 q22.1, 18 q22.2 şi 18 q 22.3). La cromosomii profazici pot apare şi sub-sub-benzi (ex.,18 q22.11. Conform unor standarde internaţionale, fiecare bandă este definită numeric prin numărul cromosomului, braţul, regiunea, banda, sub-banda; de ex. Xp21.2 înseamnă banda 1, subbanda 2 a regiunii 2 de pe braţul scurt al cromosomului X.

Pentru a descrie sintetic un cariotip normal sau anormal, International System for human Cytogenetics Nomenclature (ISCN, 1995) a stabilit un **sistem de nomenclatură** şi o serie de abrevieri. Formula de bază cuprinde 3 itemuri, separate prin virgulă: primul precizează *numărul de cromosomi*, al doilea constituţia (normală / anormală) a *cromosomilor sexuali*, iar al treilea (prezent în funcţie de situaţie) *anomaliile* de număr sau structură ale autosomilor (reprezentate prin abrevierile din tabelul 2.5). Prezenţa unui *mozaic cromosomic* este indicată printr-o diagonală (/) care separă cariotipurile liniilor celulare componente.

46,XX sau 46,XY - cariotip normal feminin sau masculin;
Monosomie X 45,X - 45 cromosomi, un singur cromosom X;
Trisomie 47,XXY - 47 cromosomi cu doi X şi cu un Y;
Trisomie 47,XX,+21 - 47 cromosomi, la o persoană cu sex genetic feminin şi un cromosom 21 suplimentar (trisomie 21);
Mozaic 45,X/46,XX - mozaic cromosomic cu două linii celulare una cu cromosomi şi un singur X, alta normală;

Tabel 2.5 Simboluri folosite în descrierea cariotipului
(după ISCN, 1995)

A-G	Grupele cromosomice	dup	duplicaţie
1-22	Numerele autosomilor	dic	dicentric
X, Y	Cromosomii sexuali	fra	situs fragil
/	mozaicism	i	isocromosom
p	braţ scurt	ins	inserţie
q	braţ lung	inv	inversie
pter	capăt braţ scurt	mat	origine maternă
qter	capăt braţ lung	pat	origine paternă
cen	centromer	r	cromosom inelar
h	heteromorfism	t	translocaţie
del	deleţie	upd	disomie uniparentală
der	rearanjament cromosomic sau cromosom derivat	::	rupere cu reunire
+/–	înaintea numărului unui cromosom indică adăugarea / pierderea cromosomului întreg; după un număr cromosomic indică adăugrea / pierderea unei părţi din cromosom		

Pentru a defini mai amplu o anomalie de structură cromosomică (un rearanjament) se poate folosi sistemul de numerotare al benzilor şi *precizarea punctelor de ruptură*. Există

două forme de nomenclatură: una scurtă - în care se precizează cromosomii implicaţi şi punctele de ruptură; alta detaliată - care identifică punctele de ruptură şi segmentele cromosomice de la un telomer la altul[21]. În practica medicală se foloseşte mai ales *sistemul scurt*; cele mai frecvente anomalii de structură (prezentate în capitolul 8) sunt notate astfel:

Anomalii de structură	
Deleţie	46,XY,5p
Deleţie terminală	46,XY, del (5)p14
Deleţie interstiţială	46,XX,del(5)(p14p15.2)
Duplicaţie	46,XX,dup(1)(q11→q32)
Inversie	46,XX,inv(4)(p15q13)
Inserţie	46,XX,ins (6;12)(p21;q13q23)
Isocromosom X de braţ lung	46,Xi(Xq)
Marker	47,XX,+mar
Cromosom inelar	46,XX,r(18)(p11q22)
Situs fragil	46,XY,fraX(q28)
Translocaţie reciprocă echilibrată	46,XY,t(2;8)(p13;q12)
Translocaţie robertsoniană	45,XX,t(13;14)(q11;p11)

Pentru a exemplifica sistemul detaliat (utilizat de specialişti) redăm nomenclatura a două anomalii de structură prezentate mai sus:

46,XX,inv(4)(p ter→q15::q13→p15:q13→qter)

46,XY,t(2;8)(2pter→2p13::8q12→8pter; 2qter →2p13::8q12 →8qter)

3.4. HETEROMORFISMUL CROMOSOMILOR

Prin diferite tehnici de studiu s-au evidenţiat variaţii în morfologia cromosomilor omologi la un individ sau la persoane diferite (din familie sau populaţia generală). Aceste variaţii au fost numite (la Conferinţa Paris, 1971) *heteromorfism cromosomic*[22] iar cromosomul care se deosebeşte morfologic de omologul său este considerat a fi un *cromosom marker*. Deoarece regiunile cromosomice heteomorfice sunt arii de heterocromatină, bogate în ADN repetitiv şi inactiv genetic, *mărimea lor variabilă este fără consecinţe fenotipice* ("variante normale"). Unele studii relevă totuşi o frecvenţă mai mare a acestor variante heterocromatinice la clupurile cu avorturi spontane repetate sau în grupul persoanelor cu retard mintal; semnificaţia acestui fenomen este necunoscută.

S-au descris patru tipuri majore de heteromorfism cromosomic:

- mărimea cromosomului Yp (10% din bărbaţii normali au un Y mai lung sau mai scurt decât deobicei),
- mărimea heterocromatinei centromerice (benzi C) sau juxtacentromerice (mai ales la cromosomii 1,9,16),
- polimorfismul sateliţilor (în mărime),
- situsurile fragile induse de antifolaţi (peste 5% din populaţie are 60 tipuri diferite de situsuri).

Fiecare persoană posedă un heteomorfism particular (are cel puţin un cromosom marker) cu aceiaşi valoare ca şi amprentele sale; deobicei markerul se transmite nemodificat de la părinte la copil (ca un caracter dominant), putând fi folosit uneori în determinarea paternităţii)

---

[21] În acest caz se folosesc câteva semne: → indică "de la...până la"; **::** descrie reunire şi rupere. **;** separă cromosomii implicaţi. **der** - cromosom derivat. **ter** - capătul terminal al cromosomului.

[22] Se foloseşte uneori şi termenul polimorfism dar acesta a fost rezervat pentru variantele alelice ale unei gene.

INTERNET

1. Dicţionar de biologie celulară: http://www.mlab.gla.ac.uk/~julian/Dict.html
2. European Bioinformatics Institute (EBI): http://www.ebi.ac.ku
3. Indiana University Biotechnology: http://www.biotech.chem.indiana.edu
4. Genome Data Base: http://gdbwww.gdh.org/
5. Genethon (France): http://www.genethon.fr
6. National Center for Genomic Resources: http://www.ncgr.org
7. National Center for Biotechnology information (NCBI): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
8. National Human Genome Research Institut: http://www.nhgri.nih.gov
9. Nature –Genome gateway: http://www.nature.com/genomics/huamn
10. Institute for genomic research: http://www.ftp.tigr.org
11. Citogenetica: http://www.kumc.edu/gec/geneinfo.html
12. Citogenetică moleculară: http://www.mpimg-berlin-dahlem.mpg.de/~cytogen/

Bibliografie specifică selectivă

1. Bernardi G. *Human genome organization* . Curr.Opin,Genet.Develo. 1995; 5:315-322
2. Deloukas P. et al *The DNA sequence of human chromosome 20*. Nature 2001; 414:865-871
3. Dunham I. et al. *The DNA sequence of human chromosome 22*. Nature 1999; 402:489-495
4. Ekong R, Wolfe J - *Advances in fluorescence in situ hybridization* - Curr. Opin. Biotechnol. 1998, 9, 19-24.
5. Ferguson-Smith M.A., Andrews T. - *Cytogenetics analysis* - in "Emery and Rimoin Principles and practice of Medical Genetics" 3rd Edn, ed. D.L Rimoin, J.M. Connor, R. E. Pyeritz. 1996, Churchil Livingstone, New York. London. 1996, p. 253- 276.
6. Gardiner K. *Human genome organization*. Curr.Opin.Genet.Develop. 1995; 5:445-476
7. Hattori M. et al. *The DNA sequence of human chromosome 21*. Nature 2000; 405:311-319
8. Heard E, Clerc P, Avner P - *X-chromosome inactivation in mammals* - Annu.Rev.Genet., 1997, 31, 571-610.
9. Heng HHQ, Spyropoulos B, Moens PB - *FISH technology in chromosome and genom research* -BioEssays 1997, 19,75-84
10. Horn P.J., Peterson L.C. Chromatin higher order folding wrapping up transcription. Science 2002; 297:1824-1827.
11. International Human Genom Sequencing Consortium. *Initial sequencing and analysis of the human genome.* Nature 2001; 411:860-920
12. Knight S.J.L., Flint J. *Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis.* J.Med.Genet. 2000; 37:401-409.
13. Lyon MF - *X-chromosome inactivation* - Curr. Biol., 1999, 9, R235-R237
14. Manuelidis L - *A view of interphase chromosomes* - Science, 1990, 250, 1533-1540.
15. Migeon BR - *X-chromosome inactivation: molecular mechanism and genetic consequences* - Trends Genet., 1994, 10, 230-235.
16. Miller O.J. - *Chromosomal Basis of Inheritance* - in "Emery and Rimoin Principles and practice of Medical Genetics" 3rd Edn, ed. D.L Rimoin, J.M. Connor, R. E. Pyeritz., Churchil Livingstone, New York. London. 1996, p.235-252.
17. Mittelman F (ed) - *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)*- Karger, Basel, 1995.
18. Peltonen L., McKusick V.A. *Dissecting human disease in the postgenomic era.* Science 2001; 291:1224-1229
19. Rosenthal N.- *DNA and the genetic code* - N.Engl.J.Med., 1995; 331:39-41

20. Saitoh Y, Laemmli UK - *Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold*- Cell, 1994, 76, 609-622.
21. Speicher M.R., Ward D.C. *The coloring of cytogenetics*. Nature med. 1996; 2:1046-1049
22. Sutherland G.R., Baker E., Richards R.I. *Fragil sites still breaking*. TIG, 1998; 14:501-505
23. Tyler-Smith C., Willard HF.- *Mammalian chromosome structure - Curr. Opin. Gene Dev.,* 1993, *3, 390-397.*
24. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al. *The sequence of the human genome*. Science 2001; 291: 1304-1351
25. Walace D.C., Brown M.D., Lott M.T. - *Mitochondrial Genetics* - in "Emery and Rimoin Principles and practice of Medical Genetics" 3rd Edn, ed. D.L Rimoin, J.M. Connor, R. E. Pyeritz., Churchil
26. Wolffe A. *Mithocondrial disease in man and mouse*. Science; 283:1482-1488

CAPITOLUL 3

STRUCTURA, ANALIZA ŞI LOCALIZAREA GENELOR

Noţiunea de genă, cu denumirea de "factor ereditar", a fost introdusă în biologie de către Gregor Mendel (1865). El a formulat ipoteza potrivit căreia *"o pereche de factori ereditari determină un caracter şi se transmite la urmaşi independent de alţi factori"*. Gena era considerată o unitate a eredităţii, transmisă de la părinţi la descendenţi, în cursul reproducerii. La începutul secolului 20, prin contribuţia a numeroşi geneticieni (Sutton, Boveri, ş.a.) şi în special a lui Thomas Hunt Morgan, se fundamentează **teoria cromosomică a eredităţii**. În acest cadru *gena reprezintă un segment de cromosom care determină realizarea unui anumit caracter*. S-au pus astfel bazele **concepţiei clasice** despre genă; *gena era considerată o unitate de structură, recombinare, funcţie şi mutaţie*.

Descoperirea rolului genetic al ADN-lui inaugurează era modernă a geneticii. *Gena devine un segment de ADN care deţine informaţia codificată* pentru realizarea unei proteine (mai exact, pentru aşezarea secvenţială specifică a aminoacizilor în proteină), substratul biochimic al unui caracter. Ulterior relaţia *"o genă - o proteină"* devine "o genă - un produs primar specific" (proteină sau ARN). După 1970, prin folosirea unor metode de analiză directă a ADN, s-a constatat că structura şi funcţia genelor sunt mult mai complexe şi este dificil să se dea genei o definiţie spaţială, structurală şi funcţională foarte precisă. În **concepţia actuală** se consideră că gena este un ansamblu de secvenţe ale ADN necesar pentru producerea unei molecule funcţionale (proteină sau ARN); mai concis, *gena este o unitate de transcripţie.*

A. CONCEPŢIA CLASICĂ DESPRE STRUCTURA GENEI

1.GENA - UNITATE DE STRUCTURĂ A MATERIALULUI GENETIC

În concepţia clasică, *gena reprezintă un segment de cromosom, precis delimitat, continuu (indivizibil), care determină un anumit caracter fenotipic* (figura 3.1).

a). Locus

Gena ocupă în cromosom o poziţie fizică fixă, totdeauna aceeaşi, numită **locus**[1] (plural = loci). Acesta poate fi situat pe autosomi (*"loci autosomali"*) sau pe cromosomii sexuali. Cromosomii X şi Y au gene implicate în procesul de sexualizare; cromosomul X are însă şi numeroase gene care determină caractere "nesexuale", ca şi locii situaţi pe autosomi, (de ex: *grupa sanguină Xg, vederea colorată, sinteza factorilor VIII şi IX ai coagulării etc.*). Cromosomul Y are însă foarte puţine gene "autosomale".

b). Gene alele. Polialelie.

Fiecare genă se găseşte în natură, la indivizii unei specii, într-o formă "*standard*", normală sau de tip "*sălbatic*". Ea poate suferi o mutaţie, care produce o formă alternativă a genei; această

[1] Termenul de locus este frecvent folosit cu referinţă la o anumită genă (de ex., locusul hemofiliei este situat pe cromosomul X

variantă alternativă a genei ce ocupă acelaşi locus şi influenţează acelaşi caracter se numeşte **genă alelă** (figura 3.1). O genă (de ex: *A*) poate suferi însă *mai multe mutaţii* diferite (ex: A^1, A^2, A^3 ... A^n), cu efecte fenotipice variate dar limitate la acelaşi caracter[2]; rezultă *variante* alelice diferite sau **alele multiple** iar fenomenul se numeşte **polialelie**. Un exemplu clasic îl reprezintă seria de gene alele A1, A2, B şi 0 pentru locusul care determină grupul sanguin AB0. Conceptul de gene alele multiple sau polialelie trebuie înţeles la nivel populaţional deoarece o anumită persoană din grup posedă în locusul respectiv *numai una* din genele alele care există în populaţie.

Deoarece în celulele somatice (diploide) cromosomii sunt în perechi de omologi, un caracter (monogenic) va fi determinat *de o pereche de gene alele*[3] ce ocupă loci omologi (de ex., *Dd* pentru caracterul D; figura 3.1.). Genele alele, situate în loci omologi, **segregă** în anafaza meiozei I, deoarece cromosomii omologi se separă (segregă) şi gameţii devin haploizi (având un singur cromosom din perechea de omologi). Gameţii vor fi astfel *"puri genetic"*, întrucât au o singură genă din perechea de alele. Genele alele situate pe o pereche de cromosomi omologi (de ex., *Dd)* **segregă independent** de genele alele situate pe *altă* pereche (de ex., *Mm)*, formându-se gameţi cu combinaţii genice diferite (figura 3.2.).

c). Homozigot, heterozigot, hemizigot.

Genele alele (normale-*N* sau anormale-*A*) ce ocupă loci omologi pot fi i*dentice sau diferite*. În primul caz (gene alele identice) genotipul[4] ca şi organismul care le posedă este **homozigot** (*NN* sau *AA*) iar în al doilea caz (gene alele diferite) va fi **heterozigot (***NA*). Frecvent, heterozigoţii au o alelă normală şi una anormală, mutantă (*NA*); ei pot fi însă şi **heterozigoţi compuşi**, cu două alele mutante *diferite* (A^1 A^2). La bărbaţii XY, o genă "autosomală" de pe X nu are de obicei echivalent pe cromosomul Y; pentru această situaţie, diferită atât de homozigot cât şi heterozigot, se foloseşte termenul de **hemizigot**.

În cursul meiozei homozigoţii vor produce un singur tip de gameţi, deci sunt *homogametici*, iar heterozigoţii vor fi *heterogametici*, producând prin segregarea genelor alele două tipuri diferite de gameţi (*N* şi *A* sau *D* şi *d*), fiecare în proporţie de 50% (figura 3.1.).

d). Dominant, codominant şi recesiv.

La heterozigoţi, genele alele diferite se pot manifesta fenotipic diferit, în funcţie de "*forţa*" lor de expresie. Acest fenomen va fi analizat în detaliu ulterior dar, pentru moment, este util să precizăm câteva elemente importante.

Uneori, una din cele două alele diferite este mai "puternică" şi se manifestă fenotipic la heterozigoţi. Gena şi caracterul care se manifestă la heterozigoţi sunt numite **dominante** şi se notează de obicei cu majuscule. Gena care nu se manifestă fenotipic la heterozigoţi şi se exprimă numai în stare homozigotă se numeşte **recesivă** şi se notează de obicei cu literă mică;. De exemplu, la persoanele cu genotip *Na* gena *N* este dominantă şi fenotipul va fi normal; indivizii respectivi vor fi însă purtători ai unei gene recesive *a*. În acelaşi context, persoanele *An* vor fi fenotipic anormale / bolnave, deoarece gena *A* este dominantă iar genă *n*, recesivă. Genele recesive se exprimă însă la homozigoţii *aa* sau *nn.*

Alteori, ambele gene alele se manifestă fenotipic la heterozigoţi şi vor fi **codominante**. De ex. genele *A* şi *B* din sistemul multialelic ce determină grupul sanguin *ABO* sunt dominante faţă de gena *O* şi codominante una faţă de alta; genotipurile *Ao, Bo şi AB* determină fenotipurile sau grupele sanguine *A, B* şi respectiv *AB*.

2. FENOMENELE DE ÎNLĂNŢUIRE GENICĂ (LINKAGE) ŞI ÎNCRUCIŞARE CROMOSOMICĂ (CROSSING-OVER)

---

[2] Uneori, mutaţii diferite ale unei gene normale formează mai multe variante alelice care au acelaşi efect asupra fenotipului; ele se numesc **isoalele**.

[3] Excepţie fac genele de pe X la bărbaţii XY.

[4] Noţiunile de genotip şi fenotip se pot folosi şi în sens restrâns, pentru o pereche de gene ("genotip") ce determină un anumit caracter ("fenotip")

Un cromosom este alcătuit din mai multe gene nealele, ce ocupă, fiecare, un locus distinct. Ele sunt dispuse liniar în cromosomi, una după alta sau "în monom" (figura 3.1.). Prezenţa a două sau mai multe gene distincte *pe acelaşi cromosom* se numeşte **sintenie**.

2.1. ÎNLĂNŢUIREA GENICĂ

Genele situate pe acelaşi cromosom au *tendinţa* de a se transmite *împreună,* "în bloc" (o dată cu cromosomul respectiv), prin gameţi, de la părinţi la descendenţi. Acest fenomen în care genele nealele *situate aproape una de alta* pe acelaşi cromosom *nu segregă* (nu se separă) în meioză şi au *tendinţa* de a se transmite mai frecvent *împreună* în succesiunea generaţiilor se numeşte **înlănţuire genică** ("linkage" în limba engleză) **(**figura 3.3.a.). Genele dintr-o regiune cromosomică care se transmit împreună formează un *grup de înlănţuire* sau un **haplotip**.

Un exemplu clasic îl reprezintă genele din regiunea HLA (~4Mb) situată pe braţul scurt al cromosomului 6, ce cuprinde (figura 3.3.c)genele HLA de clasă I (A, B ,C), genele HLA de clasă II (DR, DP, DQ), separate de genele HLA de clasă III(vezi capitolul 16). În afara genelor implicate în răspunsul imun în această regiune se găsesc şi alte gene "non-imune" care, prin mutaţii, produc diferite boli: deficienţa în 21-hidroxilază sau *sindromul adreno-genital*, prin mutaţia genei CYP21 şi *hemocromatoza*, prin mutaţia genei HFE; genele respective se transmit strâns înlănţuit cu genele HLA din vecinătate: HLA B în primul caz şi HLA A în al doilea caz.

Trebuie să precizăm că fenomenul de înlănţuire se referă *la loci* şi nu la alele. De ex. să presupunem că locusul *D* pentru o boală genetică dominantă este înlănţuit cu alt locus *M* (care ar putea fi un marker[5] al locusului-boală/morbid); acesta prezintă două forme alelice *M* şi *m*. În unele familii alela mutantă *D* va fi pe acelaşi cromosom cu alela marker *M* (genotip *DM*) iar în alte familii cu alela marker *m* (genotip *Dm*); în fiecare caz gena *D* a locusului morbid şi alela respectivă a locusului marker se vor transmite împreună prin gameţi de la părinţi la descendenţi (figura 3.3.b).

Fenomenul de înlănţuire genică *nu este un fenomen absolut* deoarece numai genele situate *foarte aproape* una de alta se transmit totdeauna împreună, *înlănţuite* (figurile 3.3.a şi 3.4.a). În acest caz fenomenul de înlănţuire este *complet*. De ex: genele C, D, E ce determină grupul sanguin Rh, localizate pe cromosomul 1, se transmit totdeauna împreună. Pentru genele situate *mai la distanţă* una de alta, pe acelaşi cromosom, înlănţuirea genică poate fi *incompletă,* ele putând fi separate prin crossing-over (figurile 3.3.b şi 3.4b).

2.2. ÎNCRUCIŞAREA CROMOSOMICĂ (CROSSING-OVER) ŞI RECOMBINAREA GENICĂ OMOLOGĂ

a). Mecanismul CO

În profaza meiozei primare se produce o *împerechere (sinapsă) riguroasă, "genă la genă", a cromosomilor omologi* urmată de o "*încrucişare*" a cromatidelor acestor cromosomi numită şi **crossing-over** (CO): la locul de contact (*chiasmă*) cromosomii se pot "rupe" şi efectua un *schimb egal de gene* (figura 3.4.b.); astfel o genă poate trece de pe un cromosom pe omologul său şi se produce o nouă dispoziţie /aşezare a genelor parentale.Acest fenomen a fost numit **recombinare genică omologă.** Între două gene nealele situate la distanţă pe acelaşi cromosom (figura 3.3.b şi 3.4.b.) după schimbul reciproc de gene se produc, prin meioză, patru tipuri diferite de gameţi, din care două au genotipuri noi, *recombinante*. Recombinarea genelor are loc numai dacă cromatida suferă un *număr nepereche de CO* între cei doi loci.

b). Punere în evidenţă a CO.

Evidenţierea fenomenului de crossing-over între două gene se poate face prin "încrucişarea" unui *dublu heterozigot pentru acele gene şi recesivul homozigot* (figura 3.5). Teoretic ar trebui să rezulte proporţii egale de descendenţi cu aceleaşi genotipuri şi fenotipuri ca şi părinţii. În realitate,

[5] Un locus (genă sau secvenţă de ADN) marker are rolul de a "semnaliza" prezenţa unui locus boală (morbid) cu care este strâns înlănţuit, fie atunci când acesta nu se exprimă fenotipic fie în cazul în care este mai greu de identifict direct.

alături de combinaţiile parentale apar şi combinaţii noi (*recombinanţi*), datorită CO produs la dublul heterozigot.

La om fenomenul de CO şi recombinare intracromosomică a fost evidenţiat iniţial prin studiul transmiterii unor caractere determinate de mutaţii recesive ale unor gene de pe cromosomul X. În figura 3.6., din căsătoria unui bărbat (I-1) care prezintă hemofilie (**h**) cu o femeie sănătoasă rezultă patru copii sănătoşi şi un băiat (II-6) cu protanopie (**p**) (absenţa vederii colorate pentru roşu, sau daltonism). Acesta este hemizigot şi unicul său cromosom X cu alela mutantă (exprimată fenotipic), provine cert de la mamă, care va fi astfel heterozigotă (P**p**). O soră sănătoasă (II-3) a bolnavului II-6 se căsătoreşte cu un bărbat sănătos şi are trei băieţi afectaţi: hemofilie (III-1), protanopie (III-3), hemofilie şi protanopie (III-4) precum şi unul sănătos (III-2). Se poate conchide, fără dificultate, că mama (II-3) celor patru băieţi este dublu heterozigotă (hP \ Hp) şi datorită acestui lucru este uşor de înţeles naşterea celor doi băieţi afectaţi de hemofilie (III-1) sau protanopie (III-3). În cazul celorlalţi doi copii (III-2 şi III-4) s-a produs un CO în meioza maternă.

c). Caracteristicile CO.

Recombinările genice intracromosomice, produse în meioză prin crossing-over (CO), sunt fenomene *aleatorii şi imprevizibile*. Ele ascultă de o singură lege: *probabilitatea;*ca atare *frecvenţa de producere a CO între două gene/loci este direct proporţională cu distanţa fizică dintre ele*: şansele de recombinare sunt mai mici dacă genele sunt mai apropiate şi invers. Gradul de apropiere între două gene (loci) de pe acelaşi cromosom se exprimă printr-un *procent de recombinare* sau *centiMorga*n (abreviere cM): locii care sunt separaţi prin CO la 1% din gameţi se află la distanţă de 1 cM.

Recombinările genice între doi loci situaţi pe acelaşi cromosom se pot observa numai prin *studii familiale*. Explicaţia este simplă: pentru a evidenţia/demonstra o înlănţuire sau o recombinare între două gene de pe acelaşi cromosom trebuie analizată comportarea lor în meioză şi *modul în care se transmit* prin gameţi la urmaşi, deci la membrii unei familii. *Comparând* structura genică a cromosomilor urmaşilor cu cea a părinţilor se poate aprecia *frecvenţa de producere* a recombinărilor între două gene (loci), distanţa dintre ele şi poziţia lor în cromosomi. Aceste lucruri sunt posibile numai când ambii loci ai celor doi cromosomi omologi parentali au *alele diferite* iar numărul de meioze (în care s-a produs recombinarea) este suficient de mare, adică familiile sunt *mari* şi pot fi analizate pe cel puţin *trei generaţii*. Mai recent, evidentierea fenomenului de recombinare genetica poate fi realizata si prin genotiparea unor spermatozoizi individuali proveniti de la acelasi individ.

Datorită fenomenului de încrucişare cromosomică între două perechi de gene alele (de ex: *D/d* pentru un *locus-boală* şi *M/m* pentru un *locus-marker* al genei patologice), situate pe acelaşi cromosom în loci diferiţi, pot exista două posibilităţi de dispunere denumite **faze de înlănţuire (**figura 3.7**)**:

- alelă a unui locus, de ex: *D*, se poate afla pe *acelaşi cromosom* cu o alelă anumită a celuilalt locus, de ex: *M*, situaţie numită *fază de cuplare sau* **cis**;
- cele două alele *D* şi *M* ale locilor respectivi se pot găsi fiecare pe cei doi cromosomi omologi, în *fază de repulsie sau* **trans**.

În exemplul dat, genele *D* şi *M* pot fi în poziţie **cis** iar *D* şi *m* în poziţie **trans** (genotipul se notează *DM/dm*) sau invers *D* şi *M* în poziţie **trans** iar *D* şi *m* în **cis** (genotip *Dm/dM*). În analizele de înlănţuire pe care se bazează deseori diagnosticul genotipic al bolilor este important *a se stabili faza de înlănţuire* între un locus-boală *D* şi alelele *M* sau *m* ale unui locus-marker *M* sau mai precis dacă alela *D* a locusului boală se găseşte pe acelaşi cromosom fie cu alela *M* fie cu alela *m* a locusului marker. Aceasta se poate realiza numai prin studii familiale urmărind cosegregarea (transmiterea împreună) a două gene nealele în generaţii succesive, fără schimbarea fazei.

2.3. DEZECHILIBRUL DE ÎNLĂNŢUIRE ŞI ASOCIERILE.

a). Definiţie.

Diferitele gene alele ale unor loci diferiţi, situate *pe acelaşi* cromosom în faza de cuplare (cis), pot forma combinaţii sau *haplotipuri variate*. De ex., în figura 3.7 genele alele *D* şi *d* ale unui locus-boală şi *M* şi *m* ale unui locus-marker pot realiza haplotipurile: *DM, dm, Dm şi dM*. Deci locusul-boală *D* poate fi asociat, în familii diferite, fie cu alela-marker *M*, fie cu alela-marker *m*. *Frecvenţa teoretică* cu care se găsesc anumite haplotipuri (*DM sau Dm*) într-o populaţie se calculează prin produsul frecvenţelor individuale ale genelor alele ce-l alcătuiesc. Dacă se compară

frecvenţa teoretică cu *frecvenţa reală* (determinată în populaţia respectivă) se pot constata două situaţii:

- frecvenţele reale ale haplotipurilor *DM* şi *Dm nu diferă semnificativ* faţă de frecvenţa teoretică; se spune atunci că genele ce alcătuiesc un haplotip se află în **echilibru de înlănţuire**. Aceasta înseamnă că o genă alelă a unui anumit locus (*D*) se poate asocia *cu orice alelă* a unui alt locus (*M sau m*), de pe acelaşi cromosom.
- frecvenţa reală în populaţie a unui anumit haplotip (de ex., *Dm*) *este mai mare* decât frecvenţa teoretică; în acest caz se produce o **asociere alelică preferenţială** sau **dezechilibrul de înlănţuire** (linkage)**:** o anumită alelă a unui anumit locus (*D*) se va asocia pe acelaşi cromosom cu o anumită alelă (*m*) a altui locus *mai frecvent* decât ar fi de aşteptat pe bază de întâmplare.

b). Mecanism

Dezechilibrul de înlănţuire este *o caracteristică populaţională* şi nu familială, ce depinde de *distanţa genetică* dintre loci şi *vechimea mutaţiei* ("distanţa" cronologică). Explicaţia acestui fenomen este în esenţă *înlănţuirea strânsă* dintre alela boală *D* şi alela *m*, care face dificilă realizarea unui CO între ele; această înlănţuire poate fi explicată şi prin faptul că bolnavii au un strămoş comun.

Un exemplu sugestiv este reprezentat de **hemocromatoza idiopatică,** cea mai frecventă boală recesivă la om (vezi **caseta 3.1**) în care se produce o acumulare excesivă de fier la bolnavii adulţi; depozitele de fier din cord, ficat, pancreas, piele şi sistemul endocrin produc o varietate de manifestări inclusiv insuficienţă cardiacă, ciroză, deficienţă de hormoni hipofizari, diabet "bronzat" (insuficienţă pancreatică endocrină şi pigmentarea pielii). Mai multe studii multicentrice au arătat că 78% din pacienţii cu hemocromatoză au şi alela A3 a locusului HLA, în timp ce frecvenţa ei la persoanele sănătoase este de numai 27%. Pe baza acestei înlănţuiri genetice s-a localizat gena hemocromatozei (HFE) într-o regiune de cîţiva cM pe cromosomul 6p (figura 3.3.c); ulterior analiza dezechilibrului de înlănţuire a "îngustat" regiunea cercetată la 250 Kb şi a permis apoi identificarea genei HFE, în care o singură mutaţie (ce interesează codonul 282, numită C282Y) se găseşte la 85% din bolnavi. Aceasta s-a produs pe un cromsom ce avea alela HLA A3.

Dezechilibrul de înlănţuire reflectă un anumit *fond comun de gene* (genofond) al populaţiei respective. Interpretarea obişnuită a dezechilibrului de înlănţuire este că cei mai mulţi indivizi ce poartă gena mutantă (morbidă) provin dintr-un *strămoş comun ("fondator")* care a avut haplotipul cel mai des asociat cu alela mutantă (vezi şi capitolul 7).

Dezechilibrul de înlănţuire ce include un locus boală bialelic (*D* şi *d*) şi un marker permite stabilirea *vechimei mutaţiei* ce produce boala ("datarea" ei) precum şi a faptului că mutaţia a survenit la un singur individ (*"efect de fondator"*) sau independent, la mai mulţi indivizi, în arii geografice diferite (*"origine multicentrică"*). Această "paleo-antropo-genetică' poate fi demonstrată prin două exemple:

- *drepanocitoza* sau sicklemia are o vechime de 3000 de ani şi origine multicentrică (trei focare distincte în Africa şi unul în Asia);
- *deficitul în alfa-1-antitripsină* datează de aproximativ 6000 de ani şi are un singur "fondator", în Europa de Nord; acelaşi lucru pare a fi valabil şi pentru *fibroză chistică* (*mucoviscidoză*)

CASETA 3.1

OMIM 234200; 602390

Hemocromatoza

Definiţie: hemocromatoza ereditară (HE) este o anomalie autosomal recesivă a metabolismului fierului, caracterizată prin absorbţia crescută a fierului prin mucoasa gastrointestinală ce determină acumularea excesivă de fier în diferite organe ale adulţilor

Incidenţă: Frecvenţa homozigoţilor în populaţia europeană este 1/200- 1/400, iar cea a heterozigoţilor este 1/8. Prevalenţa este mult mai scăzută la asiatici şi africani.

Manifestări clinice: boala debutează la circa 40 de ani la bărbaţi şi 60 de ani la femeie (deoarece acumulările de fier sunt mai reduse datorită pierderilor menstruale) cu oboseală, dureri

abdominale şi articulare, letargie, pierdere ponderală, scăderea libidoului. Depozitarea excesivă a fierului în ficat, inimă, pancreas, piele şi sistem endocrin determină o serie de simptome incluzând ciroză, insuficienţă cardiacă congestivă sau aritmii, pigmentare cutanată, diabet zaharat, artrită şi hipogonadism.

Patogenie: neelucidată complet.

Genetică: transmitere autosomal recesivă. Gena pentru hemocromatoza ereditară (gena HFE) este localizată lângă locusul HLA, pe cromosomul 6p21.3, distal de gena A. Majoritatea genelor mutante se asociază cu alela HLA A3 („dezechilibrul de înlănţuire"), sugerând descendenţa purtătorilor mutaţiei dintr-un strămoş comun. Gena HFE a fost clonată în 1996. La 85% din cazuri s-a identificat o mutaţie unică (o substituţie cisteină/ tirozină în codonul 282. Analiza acestei mutaţii poate fi folosită ca test direct pentru detectarea bolii sau examinarea altor membri cu risc din familie. Hetrozigoţii (11% din populaţie) au un avantaj selctiv deoarece 1/3 din populaţie are anemie feriprivă.

Diagnostic: se bazează pe datele clinice, biochimice, histologice şi moleculare. Pacienţii nu au întotdeauna tablou complet. Diagnosticul se bazează pe saturaţia cu fier a transferinei serice şi concentraţia serică crescută de feritină; este confirmat prin măsurarea depozitelor hepatice de fier prin biopsia hepatică şi/ sau testarea moleculară a mutaţiilor în gena HFE.

Diagnostic diferenţial: trebuie avute în vedere alte încărcări excesive cu fier: anemia sideroblastică, porfiria cutanea tarda, atransferinemia congenitală, hemocromatoza neonatală şi hemocromatoza juvenilă;

Diagnostic prenatal: teoretic posibi dacă se cunoaşte tipul mutaţiei la părinţi (heterozigoţi). Ridică probleme etice pentru o boală cu manifestare tardivă şi tratabilă

Prognostic: bun sub tratament.

Tratament: tratament simplu, ieftin, sigur şi eficient ce constă în flebotomie (îndepărtarea unei unităţi de sânge ce conţine 160-200 mg fier) periodică.

c). Asocierile genetice

Fenomenul de înlănţuire (care se referă la locii dintr-un cromosom) nu trebuie confundat cu **asocierea** care este o relaţie statistică (pusă în evidenţă în populaţie) între un caracter (boală) şi un marker genetic.

- De ex., **spondilita anchilozantă** - o boală inflamatorie cronică ce afectează ligamentele, discurile coloanei vertebrale şi articulaţia sacro-iliacă – se asociază la 90% din bolnavi cu alela HLA B27. În populaţia generală frecvenţa bolii este circa 1% iar frecvenţa alelei B27 de 5-10 %; deci multe persoane HLA B27 nu fac boala dar au un risc de 90 ori mai mare de a o dezvolta, comparativ cu cei care nu au această alelă. Este important să precizăm că factorii genetici şi de mediu care produc această afecţiune nu sunt clari şi că *asocierea populaţională observată nu implică necesar o înlănţuire genetică*. Deoarece spondilita anchilozantă este considerată *o boală autoimună*, asocierea poate reflecta totuşi, faptul că sistemul HLA este un factor important în patogenia bolii.
- O altă asociere populaţională a fost observată între **diabetul zaharat insulino-dependent** (tipul 1) şi alelele HLA DR3 si HLA DR4. Deoarece în diabetul tip 1 autoimunitatea este un factor etiologic, se poate presupune că alelele DR3/DR4 cresc susceptibilitatea la această boală.

Se poate conchide că asocierile populaţionale reflectă participarea semnificativă a unor factori genetici sau negenetici în etiologia unor boli. Ele trebuie deosebite de înlănţuirile genetice, care se referă la poziţia unor loci în cromosomi. Dezechilibrul de înlănţuire este un caz special de asociere în care există o asociere neîntâmplătoare a unei alele specifice (de boală) cu un locus din vecinătate (marker).

c). Valoare practică.

Asocierea alelică preferenţială se foloseşte în *diagnosticul genotipic prenatal sau diagnosticul presimptomatic* al unei boli în familiile cu risc crescut. Acest lucru este posibil atunci

când se realizează asocierea preferenţială a genei pentru o boală cu o alelă specifică a unui locus marker, strâns înlănţuit cu locusul boală.

De ex., pe cromosomul 7 în apropierea genei CF pentru fibroză chistică sau mucoviscidoză (boală genetică frecventă în populaţia europeană, 1: 3500 nn) se găsesc doi markeri genetici, XV-2c şi KM-19, fiecare cu două alele (figura 3.8.). S-a stabilit că marea majoritate (90%) a indivizilor ce poartă gena CF mutantă posedă deasemeni alelele 1 (XV-2c) şi 2 (KM-19) ale celor doi markeri; acest haplotip (alela 1 - alela 2 - CF) se găseşte în populaţie doar în 20% din cromosomii ce poartă alela CF normală (restul cromosomilor "normali" având alte haplotipuri).

2.4. IMPORTANŢA TEORETICĂ ŞI PRACTICĂ A FENOMENELOR DE ÎNLĂNŢUIRE GENICĂ Ş I ÎNCRUCIŞARE CROMOSOMICĂ.

a). Importanţa teoretică.

- *Cartografierea genomului uman.* Înlănţuirea şi recombinarea genică sunt utilizate, alături de alte metode, pentru localizarea genelor în cromosomi. Fără a intra în detalii (vezi capitolul 3.D) vom preciza următoarele elemente utile în cartografierea genică: două gene care se transmit strâns înlănţuite la descendenţi sunt localizate pe acelaşi cromosom; frecvenţa de producere a crossing-overului între două gene este direct proporţională cu distanţa dintre ele; prin studii familiale, calculând frecvenţa de recombinare a genelor la descendenţi, se poate stabili poziţia lor pe cromosomi.
- *Înţelegerea mecanismelor de producere a unor mutaţii*. Uneori se poate produce în meioză o încrucişare cromosomică aberantă sau **crossing-over inegal** care poate genera mutaţii genice sau anomalii de structură ale cromosomilor. El rezultă printr-o *împerechere imperfectă* a unor secvenţe asemănătoare de pe cromosomii omologi; *schimbul de segmente prin CO nu se face egal* şi pot rezulta *deleţii şi duplicaţii* genice sau cromosomice (figura 3.9.); acestea au deseori consecinţe fenotipice negative. Cel mai sugestiv exemplu pentru acest mecanism îl reprezintă tulburările de vedere colorată (protanopia şi protanomalia - pentru *roşu* şi deuteranopia şi deuteranomalia - pentru *verde*) (vezi **caseta 3.2**).
- *CO inegal* a avut însă, foarte probabil, şi un rol pozitiv în evoluţie, generând *duplicaţia sau hiperduplicaţia unor gene ancestrale*. Au rezultat mai multe "exemplare" ale genei iniţiale care, ulterior, au evoluat diferit; ele păstrează însă o serie de caracteristici comune formând *familii sau superfamilii de gene înrudite* (vezi cap.3.B.3.2). Un exemplu sugestiv îl reprezintă genele ce determină diferite catene polipeptice (alfa, beta, gama, delta) din structura hemoglobinelor umane. Ele au rezultat prin duplicaţia succesivă a unei gene ancestrale (figura 3.10.).

CASETA 3.2. OMIM # 303800 / 303900

Defecte de vedere a culorilor roşu şi verde

Definiţii*: incapacitatea ereditară a perceperii culorii roşu se numeşte* ***protanopie (P)*** *iar a culorii verde -* ***deuteranopie (D)****; perceperea alterată a culorii roşu este numită* ***protanomalie (PA)*** *iara culorii verde -* ***deuteranomalie (DA).***

Incidenţă*: 8% din bărbaţii caucazieni au un tip sau altul de defecte ale perceperii a culorilor roşu sau verde; frecvenţa lor la femei este mult mai mică, 1:150.*

Diagnostic*: defectele vederii colorate şi intensitatea lor se pot evidenţia folosind o serie de planşe colorate sau anomaloscopie.*

Patogenie*: vederea colorată normală este tricromatică fiind determinată de trei clase de celule cu conuri care au un pigment (opsina) ce reacţionează la culorile primare: roşu, verde şi albastru. Absenţa sau alterarea pigmentului vizual, produsă prin mutaţia genelor corespunzătoare va determina diferite defecte ale vederii colorate: dicromatopsia - când nu se percepe una din culorile primare - sau, foarte rar, monocromatopsia - nu se percep două din aceste culori.*

Genetică*: Defectele de vedere a culorilor roşu (P şi PA) sau verde (D şi DA) sunt transmise ereditar recesiv legat de X; acest fapt explică frecvenţa crescută a acestor defecte la sexul msculin. Genele pentru opsinele sensibile la culorile fundamentale au fost identificate şi*

localizate: gena pentru albastru (BCP) - pe cromosomul 7 iar genele pentru roşu (RCP) şi verde (GCP) pe Xq28, foarte aproape de gena pentru factorul VIII.

Genele pentru roşu şi verde sunt situate pe cromosomul X una lângă alta, în tandem; în mod normal există o genă pentru roşu şi 1-3 copii identice pentru gena pentru verde. Cele două tipuri de gene au o secvenţă aproape identică (96% omologie). Pentru vederea colorată normală este necesară expresia unei singure gene pentru pigmentul roşu şi a unei gene pentru cel verde.

Dispunerea în tandem şi secvenţa lor foarte asemănătoare generează frecvent împerecheri eronate în meioză si producerea unui CO inegal, între gene, modificând numărul lor (în plus sau minus) sau chiar în gene, producând modificări în structura lor sau gene hibride. Absenţa genei pentru roşu sau verde va genera protanopie şi respectiv deuteranopie iar hibrizii dintre cele două tipuri de gene - tulburările de percepţie de tipul PA şi DA.

***Prognostic**: Indivizii afectaţi au dificultăţi dar se pot "adapta" uşor la aceste situaţii.*

b). Importanţa practică

În practica medicală fenomenul de înlănţuire genică este folosit pentru s*tudiul transmiterii unei gene mutante într-o familie* şi, implicit, pentru diagnosticul de boală genetică, mai ales prenatal sau presimptomatic. Diagnosticul se face *indirect*, prin analiza *distribuţiei unei gene marker normală, uşor de identificat, cu care gena mutantă este înlănţuită*. De ex: gena pentru enzima 21 hidroxilază (care intervine în steroidogeneza) este localizată pe cromosomul 6p şi se transmite strâns înlănţuită cu gena B a complexului HLA (figura 3.3.c).

- Mutaţia genei 21-hidroxilază determină, în stare homozigotă (*aa*), un deficit enzimatic care perturbă steroidogeneza suprarenaliană (figura 3.11.a.); se produce un exces de androgeni ce determină la embrionul feminin un *grad de masculinizare* a organelor genitale externe sau sindromul adreno-genital (boală autosomal recesivă) (vezi **caseta 3.3**). Transmiterea genei mutante pentru 21-hidroxilază într-o familie şi diagnosticul bolii se pot stabili prin analiza prezenţei genei marker *HLA-B*, cu care gena mutantă este strâns înlănţuită.
- În familia A... (figura 3.11 b) s-a născut un copil (II-3) cu sindrom adrenogenital; la o nouă sarcină (II-4) părinţii solicită un sfat genetic pentru evaluarea riscului de recurenţă a bolii şi, eventual, un diagnostic prenatal. Soluţie: copilul bolnav (*aa*) moşteneşte câte o genă mutantă (*a*) de la fiecare din părinţi (sănătoşi dar heterozigoţi, *Na*); aceste gene sunt înlănţuite cu alela HLA <u>B14</u> la tată şi HLA <u>B5</u> la mamă. Determinarea grupelor HLA la copii, relevă că: primul copil sănătos B1/<u>B5</u> este heterozigot (*Na*); la al doilea <u>B14/B5</u> se decelează, surprinzător (poate şi pentru că era băiat), o formă asimptomatică a bolii; în schimb fătul (III-4) are genotipul HLA B1/B7 şi deci va fi sănatos (NN).

Valoarea diagnostică a înlănţuirilor genice dintre un locus boală şi unul marker a început să fie larg utilizată după 1980 prin folosirea markerilor ADN polimorfici .

CASETA 3.3 OMIM 201910

Deficienţa în 21-hidroxilază

***Definiţie**: deficienţa în 21-hidroxilază produce la fătul feminin grade diferite de virilizare a organelor genitale externe; este cea mai frecventă formă de pseudohermafroditism feminin; se mai numeşte sindrom adreno-genital sau hiperplazie congenitală de suprarenală.*

***Incidenţă**: 1:8000- 1:25.000 nou născuţi.*

***Manifestări clinice**. Afecţiunea este evidentă la nou născuţii de sex feminin, care prezintă o ambiguitate a organelor genitale externe (hipertrofie clitoris); circa 1/3 din astfel de cazuri nu vor avea alte manifestări (aceasta este forma cu virilizare simplă) Ceilalţi vor prezenta, în a doua săptămână de viaţă, vărsături, deshidratare/ hipovolemie şi stare de şoc, fatală fără tratament patogenic (forma cu pierdere de sare). A treia formă clinică de prezentare este virilizarea cu debut tardiv care apare în copilărie sau adolescenţă. Boala se poate manifesta şi la băieţi; ei vor avea OGE normale dar ar putea prezenta o precocitate sexuală.*

***Patogenie**. 21-hidroxilaza intervine în steroidogeneza suprarenaliană, în sinteza de aldosteron şi cortizol (figura 3.11 a). Deficienţa enzimei blochează formarea celor doi hormoni şi determină o hiperproducţie de androgeni; aceasta începe după luna III-a de gestaţie şi produce masculinizarea variabilă a OGE la fătul de sex feminin (cu XX şi ovare). De aceea boala mai este numită sindromul adrenogenital, fiind o formă de pseudohermafroditism feminin. Absenţa completă a aldosteronului produce "pierderea de sare". Absenţa cortizolului va determina o secreţie crescută şi continuă de ACTH care va duce la hiperplazia congenitală de cortico-suprarenală[6].*

***Genetică**. Boala se transmite autosomal recesiv. Rezultă prin mutaţiile[7] genei CYP21B pentru citocromul P450 implicat în steroid-21-hidroxilare. Gena este situată pe 6p în regiunea HLA III, în vecinătatea genei HLA B , cu care se transmite strâns înlănţuită. Mutaţiile prezintă o asociere alelică preferenţială cu haplotipul HLA A11, B55, DR4. Heterozigoţii, purtători sănătoşi de genă anormală, pot fi identificaţi prin analiza ADN; interesant de semnalat este faptul că ei au un avantaj selectiv, fiind rezistenţi la infectiile cu Haemophilus influenzae tip B. Cele trei forme clinice sunt produse de mutaţii diferite, cu un nivel rezidual de activitate enzimatică diferit.*

***Diagnostic**. OGE au grade diferite de virilizare, gonadele nu se palpează în labioacrot, OGI feminine, sex genetic feminin, niveluri crescute ale 17-cetosteroizilor urinari, 17-alfa-hidroxiprogesteronului şi ACTH (care se normalizează sub tratament).*

***Diagnostic prenatal**. Este posibil fie prin analiza ADN în celulele vilozităţilor coriale, fie prin determinarea 17-alfa-hidroxiprogesteronului în lichidul amniotic. Un diagnostic pozitiv va duce la administrarea maternă a unui preparat cortizolic care va preveni/reduce virilizarea OGE a fătului.*

***Scrrening neonatal** este posibil prin dozarea 17-alfa-hidroxiprogesteronului.*

***Prognosticul** vital este bun; pacienţii vor fi sănătoşi şi fertili dacă se face un diagnostic precoce şi un tratament adecvat.*

***Tratament**. Pacienţii primesc toată viaţa terapie substitutivă cu cortizol şi mineralocorticoizi; chirurgie plastică pentru corecţia ambiguităţii sexuale.*

B. CONCEPŢIA ACTUALĂ DESPRE STRUCTURA GENEI

Concepţia actuală despre structura şi funcţia genei se bazează în esenţă pe rolul genetic al ADN-lui. Gena a fost definită ca un *ansamblu liniar de secvenţe nucleotidice necesar pentru a produce un polipeptid sau o moleculă de ARN funcţional*; acest complex include secvenţe transcrise (codante şi necodante) precum şi secvenţe de reglare ale transcripţiei. În cea mai succintă definiţie *gena este o unitate de transcripţie*.

Numai o mică parte din ADN nuclear este transcrisă, formând cele aproximativ 35.000 de gene ale genomului uman. In funcţie de produsul funcţional pe care îl codifică şi de ARN polimeraza care realizează transcripţia, genele se *clasifică* în:

- gene *ribosomale* (gene de clasă I), transcrise de ARN polimeraza I , ce codifică precursorul de 45 S al moleculelor de ARNr de 28 S, 18 S şi 5,8 S;
- gene ce codifică *proteine* (gene de clasă II), transcrise de ARN polimeraza II;
- gene ce codifică *ARN de transfer* (ARN t) şi alte molecule mici de ARN, transcrise de ARN polimeraza III.

Majoritatea genelor umane au o *structură discontinuă* (alcătuită din secvenţe codante şi secvenţe necodante) pentru descoperirea căreia Richard ROBERTS şi Philip SHARP au primit premiul Nobel (în 1993).

1. ANATOMIA UNEI GENE CARE CODIFICĂ O PROTEINĂ

[6] 90% din formele de HCS sunt produse prin deficienţa 21-hidroxilazei; există şi alte deficienţe în biosinteza hormonilor steroizi, mai rare, care produc HCS şi ambiguităţi genitale asociate însă şi cu alte anomalii clinice şi biochimice.

[7] Marea majoritate a cazurilor sunt produse prin *conversie genică* (70%) sau *CO inegal* (30%).

Genele care codifică proteine prezintă *o parte centrală*, transcrisă (copiată) în ARN mesager precursor, numită şi "cadrul de lectură[8]" al informaţiei genetice deoarece conţine mesajul codificat pentru sinteza proteinei, flancată de două *părţi laterale*, netranscrise, cu rolul de *a regla* expresia genei (figura 3.12.). În descrierea acestor regiuni ne vom referi la catena 5'-3' a ADN sau *catena sens*.

1.1. REGIUNEA CENTRALĂ (cadrul de lectură) A GENEI

Regiunea centrală a genei este transcrisă *integral în ARN mesager precursor* prin acţiunea ARN polimerazei II. Această regiune este alcătuită din alternanţa regulată a două tipuri distincte de secvenţe: *exoni şi introni*, prezente sau nu în versiunea finală a *ARNm matur*, ce va părăsi nucleul.

Regiunea centrală a genei începe cu **situsul de iniţiere** (start) al transcripţiei. Care este numit, prescurtat, SIT sau INR (de la *initiator sequence)*. După S.I.T. urmează o *regiune necodantă* (transcrisă dar netranslată) de câteva sute de nucleotide şi numită **5'UTR** (de la *untranslated region*); ea conţine o secvenţă *consensus* (prezentă la toate genele)5'-CCAGCC**ATG**-3', care pare să joace un rol important dar încă nedefinit în reglarea translaţiei. Cert este ca această secvenţă conţine şi *codonul iniţiator ATG*, care semnalează locul de debut al translaţiei (va corespunde primului aminoacid în polipeptid). Urmează exonul 1.

Exonii *sunt secvenţe transcrise în ARN mesager precursor şi păstrate în ARNm matur* (denumirea lor se bazează pe faptul că sunt secvenţe ce se exprimă şi părăsesc – *exit* - nucleul. Ei sunt regiunile funcţionale din structura genei, care deobicei *codifică* anumite părţi structurale şi/sau funcţionale distincte ale proteinei, numite *domenii*. Numărul exonilor variază de la o genă la alta (între 2 şi mai mult de 50) precum şi la diferite organisme.

Este util de precizat că nu este obligatoriu ca exonii să fie întotdeauna părţi codante/translate ale genei; în unele gene unii exoni nu sunt translaţi deşi sunt prezenţi în ARNm matur (de ex., exonul 1 în gena pentru insulină). Recent s-a constatat un alt lucru surprinzător: gene diferite pot avea unul sau mai mulţi exoni identici, în consecinţă diferite proteine complexe, neînrudite, pot avea unele domenii identice. Spre exemplu, gena pentru receptorul LDL (lipoproteine cu densitate joasă) are exoni ce produc în structura receptorului domenii proteice regăsite în multe alte proteine. Explicaţia acestui fenomen nu este clară dar unii autori susţin că în evoluţie s-ar fi putut asambla gene noi din exonii unor gene preexistente.

Intronii - numiţi şi "Intervening Sequences" sau IVS (*intercalante* pentru că se interpun între exoni) - sunt secvenţe necodante, *transcrise iniţial în ARNm precursor (transcript primar) dar decupate precis şi îndepărtate ulterior din ARNm matur*[9], ce va fi alcătuit prin asamblarea exonilor. Numărul intronilor este cu unul mai mic decât cel al exonilor iar lungimea lor este variabilă, neconcordantă cu a exonilor, deobicei mult mai mare. Important de precizat este faptul că aproape toţi intronii încep întotdeauna cu dinucleotidele **5' GT** şi sfârşesc cu **AG 3'**; o minoritate a intronilor sunt delimitaţi de secvenţele dinucleotidice **AT** la capătul 5', respectiv **AC** la capătul 3'. Aceste perechi de nucleotide au rolul unor semnale (balize) pentru decuparea precisă şi corectă a intronilor. *Rolul intronilor nu este încă bine cunoscut*. Cert este că numărul şi mărimea lor variază la diferite gene, fiind cel mai adesea mult mai mari în dimensiuni decât exonii pe care ii separă. Rolul lor cel mai important este acela de a asigura posibilitatea matisării alternative, care este o sursa majoră de sporire a diversităţii proteinelor (o gena poate astfel conduce la sinteza mai multor proteine, vezi in capitolul 4.B.2). Uneori, surprinzător şi...inexplicabil, ei pot lipsi în unele gene (precum genele pentru histone, angiotensină, receptori beta adrenergici, ADN mitocondrial) iar alteori unii introni (din genele pentru NF1, factor VIII, ș.a.) pot conţine gene transcrise (în direcţie opusă) fără nici-o legătură cu gena în care se găsesc. De asemeni, la nivelul intronilor se pot găsi sevenţe cu rol reglator în funcţia genei, precum insulele CpG la nivelul genelor amprentate (vezi capitolul 4.B.2).

După ultimul exon din zona centrală transcrisă a genei există o **secvenţă 3'UTR** necodantă

---

[8] Termenul se referă la citirea şi copierea informaţiei genetice a genei, pe baza căreia se sintetizează un polipeptid; se mai denumeşte şi *ORF* (de la *Oen Reading Frame*)

[9] Procesul de asamblare a exonilor, ce va fi descris în capitolul 4, se numeşte "splicing" - în l. engleză, - "episssage" - în l. franceză; traducerea acestor termeni în limba română ar fi: înnădire, îmbinare cap la cap sau *matisare*).

(transcrisă dar netranslată). Ea începe cu unul din **codonii stop** (TAA, TAG, TGA) ce reprezintă semnalul de oprire a translaţiei sau sintezei proteinei. Secvenţa 3'UTR are spre capătul 3' un hexanucleotid **(AATAAA)** ce reprezintă **situsul de terminare al transcripţiei**; la 15-30 nucleotide în aval de acest situs se produce clivarea (desprinderea) moleculei de ARN sintetizate de pe catena matriţă a ADN. Acest punct se mai numeşte **situsul de poliadenilare**, pentru că în acest loc, la produsul de transcripţie (ARNm) se adaugă un segment de circa 200 nucleotide cu adenozină (poliadenilare), ce au rol în stabilitatea moleculei de ARNm şi transportul ei din nucleu în citoplasmă.

1.2. REGIUNILE LATERALE SAU SECVENŢELE DE REGLARE A GENEI.

Cadrul de lectură al oricărei gene este flancat de două regiuni laterale, *netranscrise*, care au rolul de *a semnaliza iniţierea transcripţiei* de către ARN polimerază şi de *a regla intensitatea ei*; mutaţii în aceste regiuni nu modifică structura de aminoacizi a proteinei codificate de genă ci numai *nivelul* ei de expresie (rata sintezei). De exemplu, mutaţii în regiunea reglatoare 5' a genei pentru beta-globină reduc sinteza catenelor beta la adult, producând boala denumită *beta-talasemie* şi/sau creşterea expresiei catenelor gama în afecţiunea denumită *persistenţa ereditară a hemoglobinei fetale*.

a**). Regiunea laterală 5'.**

Această regiune, situată în amonte de cadrul de lectură al genei, reprezintă locul unde se fixează ARN polimeraza şi serveşte la iniţierea transcripţiei; ea este numită generic **promotor** şi conţine mai multe *elemente sau module (cis-activatoare)* cu o secvenţă nucleotidică scurtă şi precis definită. Pe aceste secvenţe se fixează nişte proteine reglatoare (*trans-activatoare*) numite *factori de transcripţie* (TF II[10]) care au rolul să *fixeze şi poziţioneze* ARN polimeraza II - astfel ca transcripţia să înceapă exact la SIT, cu primul nucleotid (+1) – precum şi de a *activa* enzima. Trebuie precizat că ARN polimeraza nu poate recunoaşte direct promototul şi nu poate iniţia singură transcripţia. Este nevoie de o interacţiune complexă între enzimă, elementele cis-activatoare ale promotorului genei şi proteinele trans-reglatoare (TF II), care se vor fixa la promotor (vezi capitolul 4.B.2).

Promotorul eucariotelor superioare este divizat în trei regiuni, cu structură ("module")şi funcţii diferite (figura 3.13)

(1). **Miezul promotorului** conţine *elemente* care iniţiază transcripţia, formând *complexul transcripţional bazal*, împreună cu ARN polimeraza şi factorii de transcripţie generali (În special TF II D şi B). Aceste elemente, relativ identice la majoritatea genele care codifică proteine, sunt:

- **TATA box** (secvenţa TATAAA situată la circa 25 pb în amonte de SIT.) este locul la care ARN polimeraza II se fixează la ADN (prin intermediul TF II D). Această secvenţă este importantă în demararea *precisă* (în punctul de start) a transcripţiei, asigurând expresia genei la un *nivel bazal*; mutaţia secvenţei TATA nu împiedică iniţierea transcripţiei dar produce o deplasare a punctului de start, faţă de normal. TATA box este prezentă la majoritatea *genelor specifice de ţesut* (ex., beta-globina); la *genele comune ("housekeeping genes")* – funcţionale în toate ţesuturile - secvenţa TATA este înlocuită de **secvenţa GC** (sau *insule CpG*) datorită concentraţiei mari de dinucleotide 5'-CG- 3'.
- **Elementul BRE** (de la *TFIIB Recognition Element*), situată imediat în amonte de TATA, reprezintă locul de fixare a factorului de transcripţie TF IIB.
- **Elementul DPE** (de la *Downstream Promotor Element*) situat după SIT (la +30).

(2). Regiunea promotor proximală (de la -200 la -50) conţine elemente care modulează transcripţia bazală**.**

[10] Prefixul TF semnifică *transcription factor* iar II arată tipul de ARN polimerază cu care se asociază; urmează o literă: A,B,C,D …care specifică un anumit TF. Factorii de transcripţie sunt elemente *trans-acting,* deoarece sunt sintetizaţi de gene situate la distanţă de situsurile de acţiune şi ei migrează la acest loc. Elementele promotorului pe care se fixează TF sunt *cis-acting elements* deoarece funcţia lor este limitată la regiunea de ADN în care ei se găsesc.

- **CAAT box** (secvenţa GGCCAAT) este situată în amonte de caseta TATA (la circa 75 pb de SIT) şi fixează alţi TF (CTF şi CBF) care *modulează* transcripţia bazală, iniţiată de secvenţa TATA.
- **GC box** (secevnţa GGGCGG) sunt situate adesea la circa 90 p.b. în amonte faţă de SIT şi leagă factorul de transcripţie SP1, care moduleaza de asemeni transcripţia bazala.

(3). Regiunea promotor distală conţine o serie de secvenţe ADN care, după fixarea anumitor factori de transcripţie, produc activarea masivă a transcripţiei sau blocarea ei; ele determină astfel specificitatea tisulară şi specificitatea stadiului de dezvoltare în care are loc expresia unor gene, în anumite ţesuturi.

- **Elemente care determină expresia specifică a anumitor gene** (de ex., elemente octamerice – OCT), limitată fie la un anumit tip celular fie la un anumit stadiu de dezvoltare ontogenetică. Această acţiune este realizată de *factori de transcripţie specific tisulari*, care se fixează pe anumite secvenţe situate în regiunea 5' a genei. De ex.,expresia specifică a numitor gene în celulele eritroide este semnalată de secvenţa TGACTCAG sau AGATAA care sunt recunoscute de TF specific-eritroid NF-E2 sau GATA, iniţiind transcripţia unui set de gene în eritroblast.
- **Elemente de răspuns** (RE) modulează transcripţia unor gene în funcţie de anumite semnale extracelulare (*"expresie genică indusă"*). Aceste semnale pot fi *stimuli externi* (molecule nutritive, concentraţia unor ioni, temperatură, şoc) sau *semnale de comunicare* de la alte celule (hormoni, morfogeni) - care activează anumiţi FT ce se fixează pe elementele de răspuns le anumitor gene şi determină transcripţia lor temporară. Ex., elementele de răspuns la receptorii hormonali nucleari sau CRE - elementul de răspuns la cAMP (*mesagerul secund* prin care acţionează diferiţi hormoni şi alte molecule semnalizatoare).
- **Activatorii** ("*enhancers*") sunt elemente de reglare pozitivă care *cresc* nivelul bazal al transcripţiei, iniţiată de promotor[11]. Funcţia lor nu depinde de localizare (pot fi plasaţi şi în regiunea 3') sau orientare, fiind determinată de mai ales de fixarea unor factori de transcripţie specifici anumitor ţesuturi (stimulează activitatea unor gene specifice, de ex. cele pentru *imunoglobuline*).
- **Inhibitorii** ("*silencers*") reduc nivelul transcripţiei şi uneori represează funcţia unor gene.
- Acţiunea activatorilor şi inhibitorilor lor este *limitată* la o anumită genă de către nişte secvenţe "**izolatoare**" ("*insulators*") care blochează răspândirea efectului unor "agenţi" ce intensifică sau atenuează transcripţia.

b). Regiunea laterală 3'

Orice genă se termină în regiunea 3' cu o secvenţă netranscrisă, care flanchează "cadrul de lectură a genei" sau zona ei centrală. Această secvenţă este *imprecis delimitată şi cunoscută* dar existenţa ei certă îi conferă teoretic un rol structural sau funcţional. În această regiune se găsesc *secvenţe semnal* care afectează procesarea, stabilitatea şi durata de viaţă a ARNm. Se mai ştie că la unele gene (ex. gena beta-globinei) în această regiune 3' a genei se pot găsi secvenţe reglatoare de tip activator (enhancer).

* * *

Înainte de a încheia prezentarea "anatomiei" unei gene ce codifică o proteină vom preciza că structura descrisă reprezintă *o structură "tip" sau "cadru", cu variaţii individuale la diferite gene*. Astfel, tipurile de module (elemente) ce au foat identificate la promotorii a numeroase şi diferite gene sunt în număr limitat; acest fapt este în contradicţie cu numărul mare de gene şi reglarea lor foarte fină, în raport cu programul dezvoltării sau condiţiile externe. Dar promotorii se organizează după principiul "amestecării şi armonizării" (*mix and match*), fiecarea poate avea mai multe copii ale unui modul în cadrul unui domeniu reglator şi mai ales o combinaţie proprie de module, fapt ce îi conferă o *identitate structurală şi funcţională*.

---

[11] După fixarea proteinelor reglatoare (TF) ADN dintre secvenţa activatoare şi promotor face o buclă care permite TF fixat la activator să interacţioneze cu TF fixaţi la promotor sau cu ARN polimeraza.

Semalăm existenţa unor gene umane cu secvenţe codante *fără introni* (de ex.: genele pentru histone, genele pentru receptori hormonali sau diferiţi neuro-transmiţători şi altele) şi de asemeni existenţa (rară în genomul uman) a unor *gene parţial suprapuse* (ce folosesc cadre de citire diferite, fiecare pe o catenă distinctă a ADN; ex unele di n genele HLA de clasă III) şi chiar de gene incluse sau "*gene în gene"* (ex. gena pentru neurofibromatoza tip I sau gena pentru factorul VIII al coagulării conţin în anumiţi introni alte gene mai mici, transcrise de pe catena opusă celei folosită de gena de bază.

2. GENE COMUNE ŞI GENE SPECIFICE.

Genele ce codifică proteine se clasifică în *gene comune,* ce se exprimă în toate celulele şi *gene specifice* a căror expresie se face în anumite tipuri celulare şi/sau în anumite momente specifice.

2.1. GENE COMUNE.

Un grup restrâns de gene codifică proteine comune, ubicuitare, indispensabile funcţiilor celulare. De ex.: sinteza proteică, producerea de energie, metabolismele intermediare. Firesc, ele se exprimă în toate celulele şi se numesc **gene comune** / ubicuitare sau *"gene domestice (menajere)"* (de la *housekeeping genes*, în terminologia engleză). Caracteristici:

- reprezintă circa *1/5 din numărul total* de gene la om şi peste 90% din genele exprimate în orice tip celular;
- se află în majoritatea lor în regiunile de ADN relativ bogate în GC, deci în benzile cromosomice alcătuite din *eucromatină* (benzile R);
- promotorul este alcătuit din una sau mai multe secvenţe de tip GC box, situsuri la care se fixează un *factor special de iniţiere a transcripţiei* (Sp 1);
- transcripţia lor este de obicei *continuă* (permanentă), dar la un *nivel scăzut*;
- conţin în regiunea 5' (dar şi în alte zone) numeroase repetiţii ale dubletului 5'-CG-3' (hipometilat sau nonmetilat, contrar regulii generale); ele alcătuiesc "*insule HTF* " sau insule CG (*insule* - în sensul de grupări; *HTF* de la "Hpa Tiny Fragments", deoarece situsurile CGCG pot fi recunoscute şi clivate de enzima de restricţie Hpa II).

2.2. GENE SPECIFICE.

Circa 4/5 din genele umane au o expresie limitată spaţial sau temporal. *Limitarea spaţială* înseamnă exprimarea specifică în anumite ţesuturi (ex., neuronal, muscular etc), în anumite linii celulare (ex., celulele derivate din creasta neurală), în anumite tipuri celulare (ex., celule eritroide) şi chiar celule individuale (ex,limfocitele B, neuronii olfactivi). Acest proces implică intervenţia unor mecanisme particulare de reglare a expresiei genice şi stă la baza diferenţierii sau specializării celulare. *Limitarea temporală* se referă la expresia unor gene în anumite stadii (momente specifice) ale dezvoltării, diferenţierii sau ciclului celular.

3. GENE UNICE ŞI FAMILII DE GENE.

3.1. GENE UNICE SAU CVASIUNICE. PSEUDOGENE

Marea majoritate a genelor sunt reprezentate de **gene unice (**mai exact două copii alelice prezente în genomul diploid) al căror plan structural coincide cu cel descris anterior (secvenţa CAAT poate însă lipsi).

Unele gene au fost însă *duplicate* în cursul evoluţiei: uneori cele două copii sunt cvasiidentice şi pot fi folosite aleatoriu în transcripţie, când una când alta (ex. genele $\alpha 1$ şi $\alpha 2$ pentru alfa-globină); alteori, cele două copii au suferit mici modificări care nu le alterează funcţia,

iar expresia lor individuală se face fie în diferite perioade de ontogeneză (ex., genele pentru catenele de globină ε, γ, δ şi β), fie în ţesuturi /organe diferite (ex. genele pentru amilaza salivară sau pancreatică) sau compartimente celulare diferite (genele pentru isozimele citoplasmatice şi mitocondriale diferite enzime).

Unele copii produse prin duplicaţia genelor[12] sunt *defective* şi, de obicei, nefuncţionale; dacă ele cuprind întreaga structură a genei se numesc **pseudogene** (se notează cu litera grecească psi- ψ) iar dacă sunt alcătuite numai dintr-o parte a genei se numesc **gene trunchiate** sau **fragmente de genă.** De ex., gena NF1 (neurofibromatoza tip I), situată pe 17q11.2 are cel puţin 11 pseudogene sau fragmente de genă localizate în regiunile pericentromerice a şapte cromosomi diferiţi; gena PKD1 (ce produce ADPKD sau boala polichistică renală a adultului) situată pe 16p13.3 are în imediata ei vecinătate trei copii trunchiate a circa 70% din gena normală. Probabil singura pseudogenă funcţională este *gena θ pentru globină* (din familia β globinei; figura 3.14.a): ea codifică un polipeptid care însă nu este încorporat într-o moleculă funcţională de hemoglobină.

3.2 FAMILII ŞI SUPERFAMILII DE GENE.

În genomul uman există numeroase gene funcţionale care prezintă un grad mai mare sau mai mic de secvenţe similare. Genele cu *structuri asemănătoare* alcătuiesc **familii de gene.** În funcţie de gradul de înrudire al secvenţelor pe care le au membrii familiei se pot deosebi mai multe tipuri.

a). Familii "clasice" de gene.

Genele ce alcătuiesc o astfel familie au o *structură cvasiidentică* (de ex., familia genelor pentru histone şi cea a genelor ARNr) sau foarte asemănătoare (ex., familia alfa sau beta globinei)**(**vezi figura 3.14 şi *caseta 3.3***)** şi de aceea se consideră că foarte probabil au o *origine comună*, ele rezultând prin duplicaţia succesivă a unei *gene ancestrale* (figura 3.10). Deşi copiile au evoluat apoi independent şi divergent, fiecare continuă să *producă proteine relativ asemănătoare, structural şi funcţional*. Unele gene din familie pot să nu funcţioneze, formând pseudogene

Elementele ce compun o familie de gene pot fi uneori *dispersate* în genom (de ex. familia genelor pentru colagen, actină, miozină ş.a.); alteori, ele sunt *grupate* ("clusters"), foarte aproape una de alta, într-o anumită regiune a unui cromosom (de ex. familiile genelor globinei, a hormonului de creştere, ş.a.) sau în mai mulţi cromosomi (de ex., familiile genelor pentru histone, genelor pentru receptorii olfactivi).

CASETA 3. 4

Familiile alfa şi beta globinei

Genele hemoglobinei, sunt repartizate în două familii, situate pe cromosomi diferiţi: familia alfa-globinei şi familia beta globinei (figura 3.14.a.). Toate genele au aceeaşi structură fiind alcătuite din 3 exoni şi 2 introni şi derivă probabil prin duplicaţii succesive dintr-o genă ancestrală (figura 3.10)

***Familia genelor alfa-globinei** - este situată la capătul distal al braţului scurt al cromosomului 16 (locus HBA din 16p13); este alcătuită din patru gene funcţionale: zeta (ζ), alfa 2 (α2), alfa 1 (α1) şi teta (θ) - care produc fiecare un polipeptid de 141 aminoacizi. Familia alfa globinei conţine de asemenea 3 pseudogene (ψ), nefuncţionale. Ordinea genelor în familia α - globinei (descrise în direcţia 5' → 3') este următoarea: ζ- ψζ- ψα² - ψα¹ - α² - α¹ - θ. Gena zeta (ζ) se exprimă numai în perioada embrionară (figura 3.14); genele alfa 2 şi alfa 1 încep să se exprime în perioada fetală şi rămân active toată viaţa (produc proteine identice şi contribuie în mod egal la sinteza catenei alfa-globinei); gena teta este o pseudogenă funcţională dar produsul său proteic nu a fost încă identificat în condiţii fiziologice.*

***Familia genelor beta-globinei** - se află la extremitatea distală a braţului scurt al cromosomului 11 (locus HBB din 11p15); conţine cinci gene funcţionale: epsilon (ε), gama (γ)-G,*

[12] Pseudogenele pot să apară şi prin retrotranspoziţie: ARNm produs de o genă activă formează sub acţiunea transcriptazei inverse o copie de ADNc care se inseră în ADN; neavând promotor această copie este nefuncţională

gama (γ)-A, delta (δ) şi beta (β), care codifică fiecare un peptid de 147 aminoacizi. Există o singură pseudogenă. Ordinea genelor ce alcătuiesc familia beta-globinei este următoarea: $\varepsilon - {}^{G}\gamma - {}^{A}\gamma - \psi\beta - \delta - \beta$. Gena epsilon este activă în perioada embrionară (formând hemoglobinele embrionare: Hb Gower 1 - $\zeta^2\varepsilon^2$ şi Hb Gower 2 - $\alpha^2\varepsilon^2$); genele gama se exprimă în perioada fetală (formând Hb fetală Hb-$\alpha^2\gamma^2$) dar imediat după naştere transcripţia lor diminuă brutal fiind înlocuită de sinteza lanţurilor beta şi producerea de Hb A ($\alpha^2\beta^2$); în aceeaşi perioadă începe să funcţioneze şi gena delta care va participa la sinteza Hb A2 ($\alpha^2\delta^2$) dar expresia sa este slabă (Hb A2 = 2%). Se remarcă faptul că genele globinei se exprimă în diferite perioade ontogenetice în ordinea 5'→3' în care se găsesc pe cromosom (figura 3.14.b).

b). Familii de gene ce codifică produse cu domenii mari identice ("conservate")

În acest grup sunt incluse familiile care codifică *factori de transcripţie* (ex., familiile genelor HOX, PAX, SOX, POU etc, ce intervin în embriogeneză); ele au în comun o secvenţă ce codifică *un domeniu/motiv* identic al proteinei, cu care aceasta se fixează pe ADN genei ţintă (de ex domeniul *homeobox* pentru genele HOX).

c). Familii de gene ce codifică produse cu un motiv scurt de aminoacizi identici

În acest caz membrii familiei au o structură diferită exceptând o secvenţă scurtă, identică, de aminoacizi care va determina o funcţie asemănătoare (ex., familia ankirinei implicată în interacţiuni proteină-proteină).

d). Superfamilii de gene.

O genă ancestrală poate forma printr-un fenomen de hiperduplicaţie, produs precoce în evoluţie, un număr mare de copii genice care, evoluând divergent, vor prezenta structuri şi funcţii diferite. Totuşi, ele vor mai păstra un *"motiv" structural identic* şi vor interveni în procese corelate. Cel mai cunoscut şi mai frumos exemplu îl reprezintă **superfamilia genelor imunităţii** care include genele pentru imunoglobuline, genele pentru receptorii limfocitelor T, genele complexului major de histocompatibilitate (HLA), dar şi alte gene implicate în recunoaşterea celulară în sistemul nervos (genele pentru molecule de adeziune celulară sau pentru glicoproteinele asociate cu mielina). Toate aceste gene conservă structura terţiară a unităţii de bază (figura 3.15). Un alt exemplu de superfamilie îl reprezintă genele ce codifică **receptorii nucleari pentru hormoni**.

4. ELEMENTELE GENETICE MOBILE

Genele nu au întotdeauna o poziţie fixă în genom. Unele secvenţe de ADN sunt capabile să *îşi schimbe localizarea în genom*, fără să apară însă niciodată în formă liberă şi individualizată în celulă. Deplasarea unor secvenţe de ADN dintr-o poziţie în alta a fost numită **transpoziţie** iar secvenţele respective *elemente genetice mobile, elemente transpozabile* sau **transposoni**.

Transposonii au fost identificaţi iniţial la porumb (Barbara Mc. Clintock, Premiul Nobel, 1983) şi ulterior la numeroase specii de procariote şi eucariote, plante şi animale; deşi mai puţin frecvenţi la mamifere, existenţa lor a fost recunoscută inclusiv la om, putând fi uneori o sursă de mutaţii.

În prezent, elementele transpozabile prezente la om se împart în două categorii, în funcţie de mecanismul transpoziţiei: **transposoni şi retrotransposoni.**

(1) **Transposonii** sunt secvenţe de ADN copiate prin transpoziţie mediată de ADN; transposonii sunt rari la om (mai cunoscut este transposonul *Mariner*). Structura transposonului include şi genele ce codifică enzimele (*transpoază, rezolvază*) necesare inserţiei sale în genom; Mecanismul transpoziţiei implică secţionarea catenelor ADN la locul ţintei (prin acţiunea *transpoazei*), poziţionarea în această breşă a unei copii ADN (deobicei incomplete) a transposonului (realizată prin replicare) şi sudarea capetelor (cu ajutorul *rezolvazei*).

(2) **Retrotransposonii** şi alte secvenţe înrudite, la care transpoziţia este realizată prin intermediul ARN; alcătuiesc marea majoritate a elementelor transpozabile cunoscute la om. Mecanismul retrotranspoziţiei: transcriptul primar ARN al unor secvenţe de ADN este convertit - sub acţiunea *transcriptazei inverse* - într-o formă de ADN complementar care este reinserat înapoi într-un alt situs din ADN cromosomic. Structura

elementelor retrotranspozabile, care suferă transpoziţia mediată de ARN, este variată: unii au origine *virală*, posedă gena pentru *transcriptază inversă* şi sunt capabili de transpoziţie independentă; în această categorie se includ **retrotransposonii** (de ex., familia LINE-1) şi **retrovirusurile endogene,** care seamănă cu retrovirusurile dar au o structură modificată ce îi face incapabili să infecteze noi celule (ex., familia HERV/RTLV); alţii au origine *nonvirală*, nu produc transcriptază inversă şi suferă retrotranspoziţia folosind revers transcriptaza codificată de alte elemente; în această grupă se includ **retropseudogenele** de tipul familiei *Alu*

IHGSC a stabilit recent (2001) că în **schiţa secvenţei genomului uman** circa *45% din secvenţele repetitive sunt derivate din elemente genetice mobile, în special retrotransposoni*. La mamifere şi om, elementele transposabile sunt de patru feluri: LINEs (*long interspererser elements,* de circa 6kb; reprezentaţi în special de familia L1), SINEs (*short interspersed elements, circa 100-400 pb;* reprezentaţi în special prin familia *Alu*), retrotransposoni LTR (elemente asemănătoare retrovirusurilor) şi transposoni ADN „fosili" (asemănători cu transposonii bacterieni). Primele trei categorii *transpozează* prin intermediul unei copii de ARN, deci sunt *retrotransposoni*.

Transposonii au fost implicaţi în diferite procese:

- *modificarea structurii şi funcţiei unei gene* în care se inseră un transposon; acesta aduce fie o "informaţie" anormală, fie o secvenţă-control nepotrivită; au fost descrise cazuri de hemofilie A produse prin inserţia unei secvenţe LINE 1 într-un exon al genei şi cazuri de neurofibromatoză produse prin inserţia unei secvenţe *Alu în genă.*
- *transferul unor exoni sau chiar a unor copii de gene* ce pot fi eventual procesate dacă sunt inserate lângă un promotor; de ex., s-au descris copii autosomale ale unor gene situate pe cromosomul X ;
- realizarea unor *"puncte fragile"* în cromosomi, la locul de inserţie; ruperea cromosomilor în aceste puncte şi rearanjările ulterioare ale materialului genetic pot juca un rol în evoluţie.

Existenţa elementelor genetice mobile, care încă nu şi-au dezvăluit toate secretele, dovedeşte că genomul are o anumită *plasticitate*. Fenomenul nu se limitează numai la aceste elemente deoarece rearanjamentele ADN se întâlnesc şi în funcţionarea genelor imunoglobulinelor.

C. METODE DE CLONARE ŞI ANALIZĂ A GENELOR. (TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT)

Până în 1970 genele erau entităţi materiale inaccesibile analizei directe din cauza dimensiunilor foarte mici şi imposibilităţii obţinerii unei cantităţi suficiente de material pentru studiu. În acel an s-au descoperit *enzimele de restricţie*, veritabile "bisturie" genetice, cu ajutorul cărora a devenit posibilă secţionarea ADN şi izolarea genelor. Aproape concomitent s-au introdus alte noi tehnologii de studiu ale ADN, care au făcut posibilă combinarea moleculelor de ADN de la diferite specii (ADN recombinant) precum şi clonarea genelor.

Termenul de **ADN recombinant** se referă la *combinaţiile noi de ADN obţinute între anumite secvenţe de ADN uman (sau de la alte organisme) şi molecule de ADN bacterian (sau de la alte specii), capabile să se replice indefinit (formând clone moleculare) sau să exprime, într-o celulă gazdă, informaţia genetică pe care o conţin.*

Tehnicile de ADN recombinant au inaugurat "era ingineriei moleculare" care schimbă *statutul* geneticienilor, transformîndu-i din observatori în "manipulatori" de gene. În numai două decenii, s-au obţinut rezultate extraordinare în descifrarea structurii şi funcţiei genelor şi aplicarea noilor cunoştinţe în medicină (pentru depistarea, diagnosticul şi tratamentul bolilor), industria farmaceutică (obţinerea de proteine terapeutice şi noi vaccinuri), agricultură şi zootehnie (utilizarea unor biotehnologii în ameliorarea plantelor şi animalelor). Se poate afirma fără nici o rezervă că tehnologia ADN recombinant a produs o noua şi importantă revoluţie în biologie şi medicină, comparabilă cu descoperirea microscopului, care a deschis *era medicinii moleculare.*

Tehnicile ADN recombinant se pot grupa în două mari categorii:

- *clonarea ADN* sau *amplificarea selectivă* a unei gene / secvenţe de ADN, bazată în esenţă pe multiple runde de replicare a ADN, care vor produce un număr mare de copii ale fragmentului respectiv; clonarea poate fi *celulară, in vivo,* când se foloseşte mecanismul natural al replicării ADN sau *acelulară, in vitro,* bazată pe reacţia de polimerizare în lanţ (PCR).
- *analiza ADN* sau *detecţia specifică* a unei secvenţe de ADN sau ARN, bazată pe hibridizarea moleculară (prin complementaritate) a unei *sonde* marcate de acid nucleic, cu secvenţa respectivă.

1. CLONAREA ADN ÎN CELULE.

Clonarea ADN *in vivo* utilizează mecanismul natural de replicare al ADN în celule şi implică patru etape majore (figura 3.16):

- *formarea ADN recombinant,* prin ataşarea *in vitro* a fragmentelor de ADN uman la *"un vector sau replicon "* capabil de *replicare independentă*;
- *transformarea:* moleculele de ADN recombinant sunt transferate în *celule gazdă* în care vectorul recombinant se replică independent de cromosomul celulei gazdă;
- *amplificarea* sau producerea de clone celulare multiple.
- *izolarea clonelor de ADN recombinant* prin oprirea culturilor şi izolarea selectivă a ADN recombinant.

1.1. OBŢINEREA UNOR GENE/ FRAGMENTE DE ADN.

Pentru obţinerea unor fragmente de ADN în vederea amplificării şi analizei ulterioare, se pot folosi trei metode: secţionarea ADN genomic, cu ajutorul *enzimelor de restricţie*; formarea unei copii de ADN complementară unei molecule de ARN mesager extras din citoplasmă, utilizându-se *transcriptaza inversă*; sinteza artificială (chimică) prin polimerizarea nucleotidelor după o secvenţă prestabilită, cu ajutorul *ADN polimerazei*.

a). Secţionarea ADN cu enzime de restricţie

Enzimele de rectricţie[13] sunt mijloace naturale de apărare ale unor bacterii contra infecţiilor cu virusuri; bacteriile reuşesc să *limiteze* (în engleză, *"to restrict"*) creşterea virusului infectant, printr-un proces în care ADN fagic este *selectiv recunoscut şi degradat enzimatic*, în timp ce ADN bacterian rămâne *protejat* de această acţiune distructivă[14].

Enzimele de restricţie nu secţionează ADN la întâmplare ci *au un grad înalt de specificitate*: ele "scanează" ADN şi se opresc atunci când recunosc o secvenţă nucleotidică specifică, numită *situs de recunoaştere şi clivare* sau **situs de restricţie**.

Situsul de restricţie este alcătuit de obicei din 4-6 perechi de baze (rar mai mult de 8 sau mai multe), dispuse în *palindrom* deci *inversate* (o catenă are secvenţa inversă a celeilalte catene; ambele catene "citite" în sensul 5'→ 3' au însă aceiaşi secvenţă) (tabel 3.1.). Situsurile de restricţie sunt localizate de regulă *în regiunile intergenice necodante*; rareori pot fi şi intragenice, găsindu-se deobicei în introni.

Tabel 3.1. Exemple de enzime de restricţie şi situsuri de recunoaştere şi clivare
(adaptat după Gelherter şi Collins, 1998)

ENZIMA DE RESTRICŢIE*	SURSA	SITUS DE RESTRICŢIE
Alu I	Arthrobacter luteus	5'AG↓CT3'

[13] Enzimele de restricţie au fost descoperite în 1970 de către Arber, Nathans, şi Smith (Pr. Nobel, 1978)

[14] Enzimele de restricţie posedă deasemeni capacitatea de *a metila ADN propriu*, la nivelul aceloraşi situsuri de clivaj şi astfel de a-l proteja contra propriei degradări.

		3'TC↑GA5'
Bam H I	Bacilus amyloliquefaciens H	G↓GATCC CCTAG↑G
Eco R I	Escherichia Coli RY 13	G↓AATTC CTTAA↑G
Hae III	Haemophilus aegipticus	GG↓CC CC↑GG
Not I	Nocardia otitis	GC↓CGGCCGC CGGCCGG↑CG
Taq I	Thermus aquaticus	T↓CGA AGC↑ T
* Nomenclatura: prima literă=genul bacteriei; a doua literă şi eventual a treia=specia; a treia literă=suşa; o cifră = numărul de ordine.		

Enzimele de restricţie secţionează *ambele catene* ale moleculei de ADN la sau lângă situsul de restricţie; ele sunt *endonucleaze* deoarece hidrolizează legăturile fosfodiester dintre nucleotide, totdeauna spre interiorul moleculei. Se cunosc câteva sute de enzime de restricţie, deosebite prin sursa bacteriană din care provin şi secvenţele nucleotidice pe care le recunosc şi clivează în ADN.

După modul în care secţionează ADN în situsul de recunoaştere enzimele de restricţie sunt de două feluri (tabelul 3.1): unele enzime (de ex. Eco RI) realizează *secţiuni asimetrice* (decalate) ale catenelor şi produc fragmente care au *capetele "proeminente*", cu o prelungire de 4 baze pe una din catene; aceste capete se mai numesc "*adezive* (coezive)" deoarece au tendinţa să se asocieze unul cu altul sau la o altă extremitate ce posedă o secvenţă complementară (figura 3.16); alte enzime (de ex. Hae III) taie simetric (la acelaşi nivel) ambele catene şi produc capete "drepte"; ele nu se pot asocia spontan, ca în primul caz, ci numai sub acţiunea unor ADN ligaze. Există de asemeni enzime a căror activitate este inhibată de prezenţta metilării ADN (precum HpaII sau NotI), sau dimpotrivă, care sunt capabile să secţioneze la nivelul situsului de restricţie numai atunci când ADN-ul este metilat.

Clivarea moleculei de ADN cu o anumită enzimă de restricţie "fragmentează" ADN într-un *număr definit, caracteristic şi reproductibil de fragmente*, care reflectă localizarea şi frecvenţa situsurilor specifice de clivare sau **harta de restricţie**. Situsurile de restricţie sunt dispuse la distanţe variate iar fragmentele produse prin secţionare sunt inegale; pe această bază, ele pot fi uşor separate prin electroforeză.

În acest context este util de subliniat un ultim aspect privind situsurile de resctricţie. Diferite mutaţii pot modifica situsul de restricţie (care nu va mai fi cunoscut de enzimă) sau pot crea situsuri noi. De aceea clivarea ADN cu aceiaşi enzimă de restricţie va produce la persoane diferite din populaţie fragmente de ADN cu lungimi diferite. Se realizează un amplu fenomen de *"polimorfism al lungimii fragmentelor de restricţie"* (RFLP), care poate fi folosit ca un marker genetic preţios în diagnosticul unor boli genetice (vezi capitolul 9.B.2).

În afara acestor particularităţi trebuie să precizăm un lucru important: o anumită enzimă de restricţie produce *capete adezive indentice* atunci când secţionează molecule de ADN diferite (figura 3.16) . Datorită acestei caracteristici *două fragmente de ADN cu origini diferite dar produse de aceiaşi enzimă de restricţie se pot uni pe bază de complementaritate producând o moleculă hibridă de ADN recombinant*[15].

Enzimele de restricţie au devenit instrumentul de bază al ingineriei genetice, "bisturiul" cu care se fac toate "operaţiile moleculare" asupra ADN: corecţii, amputaţii şi mai ales "transplante" de gene.

b). Obţinerea de ADN complementar

[15] Această moleculă hibridă, ce reuneşte segmente de ADN de la specii diferite, se mai numeşte şi moleculă de ADN "himerică"

O altă metodă de a obţine gene foloseşte ca material de lucru *ARN mesager*, produsul (transcriptul) primar al genei, extras din citoplasma unei celule care îl sintetizează din abundenţă (de ex., ARNm pentru beta-globină izolat din hematii tinere). Molecula monocatenară de *ARN mesager serveşte ca matriţă* pentru sinteza unei catene de **ADN complementar** (ADNc) realizată de enzima *transcriptază inversă*.. Pe baza primei catene de ADN se sintetizează şi cea de a doua catenă; astfel se obţine o moleculă ADNc bicatenar care va corespunde genei (mai exact exonilor din genă) care în celulă a produs (prin transcripţie) ARNm ce a servit ca matriţă pentru ADNc. În acest mod s-a sintetizat pentru prima dată gena pentru beta globină.

c). Sinteza "artificială" (chimică) a unor fragmente de ADN.

Metoda se bazează pe *polimerizarea deoxiribonucleotidelor* ce alcătuiesc o catenă de ADN, într-o *ordine prestabilită/determinată anterior*. Ea se deduce pe *baza secvenţei de aminoacizi a proteinei* codificată de genă, cu ajutorul codului genetic, care stabileşte pentru fiecare aminoacid codonul (trinucleotidul) corespunzător. Alteori, secvenţa de nucleotide a genei ce va fi sintetizată se stabileşte prin alte metode. Această tehnică se foloseşte mai des pentru obţinerea unor *oligonucleotide corespunzătoare unei părţi din genă*, utilizate fie ca sonde fie ca amorse, în alte tehnici de analiză moleculară.

1.2. CONSTRUCŢIA MOLECULELOR DE **ADN RECOMBINANT**

După obţinerea unor fragmente de ADN uman analiza sau utilizarea genelor necesită *multiplicarea fragmentului* într-o cantitate suficientă. Pentru aceasta, *genele se inseră* într-un **replicon** sau **vector** şi cu ajutorul lui sunt introduse într-o **celulă gazdă** (bacterii, levuri etc), unde vor fi multiplicate. Deoarece vectorii pot forma prin replicare un număr mare de copii per celulă şi întrucât gazdele pot fi crescute indefinit în laborator se pot obţine mari cantităţi din secvenţa de ADN inserată (genă).

Unirea a două fragmente de ADN de origini diferite produce o moleculă de **ADN recombinant**. Pentru aceasta, moleculele de ADN din cele două surse sunt secţionate cu *aceiaşi enzimă de restricţie*; se produc capete complementare identice care fiind coezive se pot uni pe bază de complementaritate şi produce o moleculă hibridă de ADN recombinant (figura 3.16). Legăturile sunt stabilizate cu ajutorul unei *ADN ligaze.* Talia fragmentului exogen inserat depinde de tipul de vector.

a). Vectorii.

Un vector este o moleculă naturală de ADN utilizată pentru *transportul* secvenţelor de ADN exogen într-o celulă gazdă. El trebuie să fie capabil să *se replice activ şi independent* de genomul gazdei (de aceea se mai numeşte şi *replicon*), din care apoi va fi izolat în formă pură. Vectorul care include un fragment de ADN exogen se numeşte *vector recombinant* iar procesul de încorporare a plasmidelor recombinante în celulele gazdă este numit **transformare**

În tehnicile de clonare se utilizează frecvent patru tipuri principale de vectori, deosebiţi prin *mărimea fragmentelor de ADN exogen pe care-l pot insera*: plasmide, bacteriofagi, cosmide, cromosomi artificiali (tabelul 3.2.)

Tabel 3.2. Exemple de vectori folosiţi frecvent în clonarea moleculară

(după Thompson şi Thompson, 2001)

Vectori	Gazde	Tip ADN clonat	Mărimea fragmentului inserat
Plasmide	bacterii, levuri	genomic, ADNc	până la 10 kb
Bacteriofagi Lambda	bacterii	genomic, ADNc	până la 20 kb
Cosmide	bacterii	genomic	până la 50 kb
Cromosomi "artificiali" BACs şi YACs	levuri	genomic	între 100-1000 kb

(1) **Plasmidele** - se găsesc natural în bacterii, cărora le conferă rezistenţa la diferite antibiotice şi metale grele. Ele sunt alcătuite dintr-o moleculă mică (de circa 2-5 Kb) de ADN bicatenar circular extracromosomial, care se replică complet independent de cromosomul bacterian. Prezintă un situs de iniţiere a replicării (origine) şi unul sau mai mulţi markeri de selecţie (de obicei gene care conferă rezistenţă la antibiotice). Au un situs unic de restricţie (situat într-o genă de"selecţie") unde poate fi inserat un fragment de ADN exogen (de la circa 1 Kb, până la maximum 10kb) rezultând un *plasmid recombinant*.

(2) **Bacteriofagii** (sau pe scurt fagii) sunt virusuri care infectează şi distrug bacteriile. Ei posedă un sistem de penetrare a bacteriei în care îşi introduc ADN; se se replică autonom, rapid şi intens (circa un milion de copii). Multiplicarea fagului în bacterie[16] se traduce după un timp, prin liza ei. În tehnicile de ADN recombinant se folosesc în special fagii lambda (λ) ce atacă E. coli. ADN fagic bicatenar şi linear (figura 3.17), de aproximativ 45 Kb, este "împachetat" în capsula virusului. El posedă două extremităţi coezive /adezive, numite *cos* (care permit circularizarea ADN fagic pătruns în bacterie) şi un "fragment intern", neesenţial pentru replicare, care poate fi decupat şi înlocuit cu o moleculă de ADN exogen (10-20 Kb), formând fagi recombinanţi (figura 3.17). Pe culturi de geloză fagii recombinaţi se recunosc prin plaje de liză, pe un "covor" bacterian.

(3) **Cosmidele** sunt vectori artificiali constituiţi dintr-un plasmid clasic la care s-au adăugat secvenţele cos ale fagului lambda, secvenţe care permit împachetarea unor segmente de ADN exogen mai lungi decât în fagi (figura 3.26). Cosmidele funcţionează iniţial ca nişte fagi şi după infecţia bacteriei aceşti pseudofagi se recircularizează şi se replică ca un plasmid, dar mult mai lent, fiind şi mult mai mari. Avantajul cosmidelor este că permit inserţia şi clonarea unor fragmente foarte lungi de ADN (până la 50 Kb).

(4) **"Cromosomii artificiali bacterieni (BACs)"** derivă din plasmidul de fertilitate din E.Coli şi este capabil să încorporeze fragmente de ADN până la 300 kb.

(5) **" Cromosomii artificiali de levuri (YACs** de la yeast artificial chromosomes) sunt plasmide care posedă centromerul şi telomerele originale, elementele necesare replicării şi segregării mitotice a cromosomilor în cele două celule fiice de Saccharomyces cereviseae (drojdia folosită în brutării). În rest cromatidele YAC vor fi alcătuite din ADN exogen (figura 3.18). După "fabricare" cromosomii artificiali sunt introduşi în levuri şi se comportă ca şi cromosomii normali. YAC poate încorpora fragmente foarte mari de ADN (până la 1000 Kb) şi permite replicarea ADN de eucariote cu secvenţe repetitive de ADN. Totuşi multe gene umane au mărimi de 2-3 Mb şi în aceste cazuri analiza lor cu vectorii convenţionali necesită clonarea unor fragmente suprapuse de genă, din care să se reconstituie ulterior secevnţa originală şi integrală a genei[17].

(6) **Alţi vectori.** În afara celor patru tipuri principale de *vectori de clonare*, în cazuri speciale, se folosesc şi alte tipuri de vectori. *Vectorii "navetă"*, destinaţi a fi utilizaţi şi la procariote şi la eucariote. Ei pot introduce o secvenţă de ADN în celulele eucariote (transfecţie), care ulterior va fi recuperată prin clonaj într-o bacterie, în scopul studieii modificările pe care le-a suferit în celula eucariotă. *"Vectori de expresie"*. Unii vectori sunt prelucraţi într-un mod particular adăugându-li-se, în vecinătatea situsului de inserţie a ADN exogen, semnalele necesare transcripţiei. Aceşti vectori pot funcţiona în bacterii sau drojdii determinând sinteza proteinei corespunzătoare genei pe care o conţin. *"Vectorii virali"* pentru celulele eucariote sunt retrovirusurile, adenovirusurile, virusul SV 40 şi virusurile de tip Herpes. Sunt folosiţi în experienţe de introducere (încorporare) a ADN în celule eucariote numite generic *transfecţie*.

1.3. TRANSFORMAREA

Moleculele de ADN recombinant sunt *transferate* (încorporate) în *celule gazdă* (deobicei bacterii nepatogene modificate[18],) în care vectorii recombinanţi se vor multiplica *independent* (autonom) de cromosomul bacterian, formând mai multe exemplare identice. Introducerea unui vector într-o celulă bacteriană se numeşte **transformare.**

Procedura de inserţie este specifică fiecărui tip de vector (de ex. în cazul plasmidelor membrana bacteriilor va fi tratată special[19] iar în cazul fagilor, ADN recombinant va fi mai întâi "împachetat" în capsula virală).

---

[16] Uneori fagii se pot insera în cromosomul bacterian, unde rămân "tăcuţi" (sub formă de profagi) şi se pot replica odată cu acesta (ciclul lizogenic)

[17] Recent a început fabricarea cromosomilor artificiali de mamifere (MAC) sau de om (HAC) ce vor fi utilizaţi pentru transferul de ADN în culturi de celule umane (de ex. în genoterapie).

[18] Bacteriile - sunt cel mai frecvent folosite în clonarea ADN datorită multiplicării rapide (timp de generaţie 20-30 minute), facilităţii de manevrare şi costului redus. Deşi nepatogene, bacteriile sunt modificate pentru a diminua riscurile diseminării accidentale. Cel mai des se utilizează E. Coli, mai rar Pseudomonas şi Bacillus subtilis.

[19] Membrana celulei bacteriene nu este în mod normal permeabilă la moleculele mari de ADN dar poate deveni permeabilă după tratamentul cu ioni bivalenţi, şocuri electrice scurte (electroporaţie) care formează pori în peretele celular, prin care pătrund plasmidele. Totuşi numai un mic procent de celule vor fi *competente* deci capabile să

Trebuie subliniat că o celulă gazdă *competentă* fixează numai o singură moleculă de ADN recombinant; fiecare celulă transformată va forma o clonă specifică (figura 3.16)

1.4. AMPLIFICAREA

Bacteriile transformate sunt supuse multiplicării. În cazul clonării cu vectori plasmidici celulele bacteriene sunt însămânţate pe suprafaţa unei plăci cu agar, unde cresc şi formează colonii sau clone (populaţii de celule identice, descendente dintr-o singură celulă) distincte. Apoi, coloniile sunt prelevate şi cultivate individual într-un flacon cu mediu lichid, unde se produce o nouă expansiune a numărului de celule (figura 3.16). Dacă celula iniţială conţinea un vector recombinant atunci - prin multiplicarea lui precum şi a celulelor ce-l conţin - se realizează o amplificare enormă a fragmentului de ADN ataşat vectorului.

1.5. IZOLAREA CLONELOR DE ADN RECOMBINANT.

Celulele care au încorporat vectorul recombinant se vor *selecta* datorită unor caractere fenotipice particulare. Astfel, creşterea bacteriilor pe un mediu cu ampicilină selectează acele celule care conţin copii ale plasmidului (cu gena de rezistenţă la ampicilină inserată) ce conferă bacteriei rezistenţă la acest antibiotic (figura 3.16). Se formează o colonie de bacterii cu ADN recombinant. La fel, proliferarea fagilor într-o bacterie se traduce prin liza sa: pe culturi în geloză, recombinanţii nu se evidenţiază prin clone ci prin plaje de liză, pe un "fond" de bacterii normale. Prezenţa ADN recombinant în structura vectorului este adeseori identificată pe baza inactivării inserţionale a unei gene. Un astfel de sistem este acela al beta-galactozidazei. Situsul de inserţie este situat în interiorul acestei gene din structura vectorului. Prezenţa ADN recombinant va determina inactivarea acestei gene şi, ca urmare, va aboli capacitatea celulelor bacteriene transformate de a transforma Xgal într-o substanta albastră. Există şi alte metode de screening şi selecţie a clonelor de ADN. După selecţie, celule sunt procesate pentru *a se extrage şi purifica clona de ADN recombinant*. Această procedură se va face pentru fiecare colonie bacteriană ce conţine un anumit fragment de ADN genomic. Rezultă o *colecţie* sau *o bancă (bibliotecă) de clone de ADN* ("DNA libraries") din populaţia iniţială de fragmente de ADN.

1.6. CONSTRUCŢIA BĂNCILOR SAU BIBLIOTECILOR DE GENE

După punerea la punct a metodelor de clonare moleculară a devenit necesară crearea unei *colecţii de clone de ADN recombinant*, care să conţină toate secvenţele provenite dintr-o anumită sursă: ADN genomic (nuclear) (figurile 3.16, 3.17 şi 3.18) sau ADN complementar (ADNc)(figura 3.19). O astfel de colecţie se numeşte **biblioteca (bancă) de gene**, deoarece o anumită genă sau fragment de ADN poate fi obţinută pentru a fi studiată sau folosită asemenea unei cărţi într-o bibliotecă.

Identificarea clonei cu gena dorită, din ansamblul clonelor din biblioteca sau banca de gene, se face cu ajutorul unor tehnici sensibile de identificare (screening sau criblaj).

a). Biblioteci (bănci) genomice

După extragerea ADN dintr-o celulă somatică (care conţine de fapt informaţia genetică cuprinsă în genomul individului) se realizează fragmentarea prin digestia sa incompletă cu ajutorul unei anumite enzime de restricţie, care produce fragmente de o anumită mărime. Aceste fragmente sunt inserate separat într-un vector tip bacteriofag lambda (figura 3.17) sau în plasmide (mai rar în cosmide sau YAC). (figura 3.18) Se obţine o bancă cu sute de mii de vectori recombinanţi ce conţin fragmente diferite de ADN uman. O astfel de colecţie va cuprinde tot ADN din genomul uman. Una din primele bănci genomice, folosită şi astăzi de sute de laboratoare, a fost creată în 1978 de Maniatis. Pentru a uşura procesul de identificare a unei anumite gene s-au construit recent colecţii

---

încorporeze ADN din mediul extracelular. Atunci când o fac ele fixează numai o singură moleculă vector, deci numai un fragment de ADN

de clone ce corespund numai unui anumit cromosom uman (izolat printr-o tehnică specială de triere) sau chiar a unei regiuni sau benzi cromosomice.

b). Biblioteci (bănci) de ADN complementar (ADNc)

Banca de ADNc cuprinde copiile de ADNc ce corespund tuturor moleculelor de ARN mesager dintr-o anumită celulă. Construcţia unei bănci de ADNc se face în mai multe etape (figura 3.19). Mai întâi se obţine ARN total din celulă şi apoi se separă ARNm de celelalte tipuri de ARN. Cu ajutorul transcriptazei inverse se produc copii de ADNc corespunzătoare fiecărui tip de ARNm. Acestea se inseră în vectori de tip bacteriofag lambda şi astfel se obţine o bancă de ADNc.

Băncile de ADNc sunt folosite mai frecvent decât cele de ADN genomic deoarece clonele obţinute corespund numai secvenţelor codante ale genei (fără introni), deci sunt mult mai scurte. În plus se pot identifica mai uşor genele care se exprimă preferenţial sau exclusiv în celule specializate (ficat, muşchi, reticulocite) sau în diferite perioade ale dezvoltării ontogenetice (embrion, făt, adult).

c). **Identificarea unei clone.**

Pentru identificarea unei anumite clone ce conţine ADN recombinant dorit dintr-o bancă de ADN s-au utilizat diferite metode; în prezent, sunt folosite doar două tehnici: trierea cu oligonucletidele de sinteză şi trierea cu anticorpi.

- *Trierea cu oligonucleotide* de sinteză utilizează o secvenţă nucleotidică scurtă, sintetizată pe baza secvenţei de aminoacizi a unei părţi (15-20 aminoacizi) dintr-o anumită proteină, folosind corespondenţele aminoacizi → codoni stabilite de codul genetic. Secvenţa oligonucleotidică sintetizată va corespunde unei părţi din gena cercetată. Ea va fi marcată radioactiv cu ^{32} P şi apoi hibridizată cu clonele ce alcătuiesc banca de ADN. Sonda se va fixa şi identifica o anumita clonă, ce conţine gena care codifică proteina respectivă.
- *Trierea cu anticorpi* evidenţiază proteina codificată de gena cercetată, care se exprimă in vitro (într-un sistem adecvat). Complexul antigen-anticorp se va forma numai în celulele ce conţin clona cu gena respectivă; el va fi identificat prin evidenţierea anticorpului (prin tehnici speciale).

2. CLONAREA ACELULARĂ A ADN (METODA PCR)

În anul 1985, în analiza genotipică s-a produs o nouă mini-revoluţie metodologică prin introducerea tehnicii "*polymerase chain reaction*" (PCR) (Mullis şi Smith; Pr. Nobel, 1993). Cu această metodă se poate *amplifica selectiv o secvenţă scurtă de ADN sau ARN*, a cărei structură nucleotidică este parţial cunoscută. Amplificarea este considerabilă (de miliarde de ori) şi rapidă (în câteva ore), permiţând obţinerea unei cantităţi suficiente de material genetic necesar pentru analiză.

Amplificarea selectivă in vitro a unui fragment de ADN cu secvenţă cunoscută se realizează pe baza *principiului extensiei unei amorse* ("primer sau amplimer"). Tehnica foloseşte două oligonucleotide de sinteză care reproduc o secvenţă de 15-25 nucleotide situate la capătul 3' a celor două catene ale segmentului de ADN (figura 3.20); ele sunt numite **amorse** deoarece *declanşează* sinteza ADN, după "matriţa" fragmentului ADN iniţial (de amplificat); reacţia necesită, evident, prezenţa ADN-polimerazei.

Într-un prim timp, segmentul de ADN ce trebuie amplificat este *denaturat termic* (la 95^{o}C), obţinându-se un amestec de fragmente monocatenare. Apoi, în al doilea timp, se produce (la 50-60^{o}C) *poziţionarea şi hibridarea amorselor* la secvenţele complementare (situate în poziţia 3') de pe fiecare catenă. După aceea, în a treia etapă are loc *polimerizarea* nucleotidelor sub acţiunea unei ADN-polimeraze termostabilă[20](la 72^{o}C) şi fiecare amorsă este *alungită* (extinsă) în sensul 5' → 3', formându-se o secvenţă complementară catenei copiate (matriţă) (figura 3.20). La fiecare circa 3-10 minute rezultă o nouă dublare a secvenţei iniţiale de ADN.

PCR este o *reacţie în lanţ* deoarece catenele de ADN nou sintetizate vor acţiona ca *matriţe* pentru sinteza ADN în ciclurile următoare de denaturare termică, hibridizare amorselor şi polimerizare (extensia amorselor sau sinteza enzimatică ADN); se produce astfel o amplificare

[20] Este vorba de Taq-polimeraza izolată din bacteria *Termophilus acvaticus*, care creşte natural în izvoarele termale şi este stabilă la temperaturi ridicate

exponenţială a cantităţii de ADN: după N cicluri se obţin teoretic 2^N exemplare din segmentul iniţial de ADN. După 30 de cicluri, fără să fie necesară adăugarea de amorse sau enzimă proaspătă, acest segment este amplificat de circa un miliard de ori. Prin această "*clonare acelulară*" plecând de la o cantitate infimă de ADN (chiar de la o singură celulă) se poate obţine, prin PCR, o cantitate suficientă de ADN-ţintă, care poate fi vizualizată prin fluorescenţă în UV (după colorare cu bromură de etidium) şi /sau analizată direct.

Avantajele clonării acelulare a ADN prin PCR sunt determinate în primul rând de *simplitatea* sa (nu necesită nici o altă manipulare, în afara variaţiilor termice necesare diferitelor etape ale reacţiei, şi deaceea se pretează la automatizare, folosind un *termociclor*); în al doilea rând, PCR este o metodă *rapidă, sensibilă, eficace şi ieftină*.

Dezavantajele majore ale PCR sunt necesitatea unor informaţii prealabile despre secvenţa capetelor terminale ale ADN ţintă (pentru a fabrica oligonucleotide specifice), mărimea mică (0.1-5 kb în tehnicile uzuale de PCR) şi cantitea limitată de produs, precum şi infidelitatea replicării ADN (frecvenţa relativ crescută a erorilor de împerechere, care depinde de precizia ADN-polimerazei şi de existenţa sau nu a capacităţii de corecţie a erorilor)

Metoda PCR a fost aplicată cu succes la studiul diverselor tipuri de secvenţe de ADN: genomic, mitocondrial, exogen (în special viral), precum şi la molecule de ARNm, după ce în prealabil s-a obţinut cu ajutorul transcriptazei inverse o moleculă de ADN complementar unui mesager (RT-PCR sau reverse *transcripase PCR*). Tehnica PCR a revoluţionat atât analiza genetică, cât şi diagnosticul molecular al bolilor genetice, prin detecţia directă a mutaţiilor sau diagnosticul indirect prin polimorfismul RFLP sau al markerilor minisatelitici. In acest scop s-au elaborat numeroase variante ale PCR.

3. METODE DE ANALIZĂ A ACIZILOR NUCLEICI.

Analiza relaţiei fundamentale dintre genotip şi fenotip s-a bazat multă vreme pe analiza fenotipică, deci pe studiul manifestărilor genei sau explorarea produselor sale de expresie. Recent a devenit posibilă **analiza genotipică** prin *explorarea directă a ADN*. Deşi prezintă numeroase dificultăţi, analiza genotipică are o valoare teoretică şi practică deosebită.

În planul *cercetărilor fundamentale* analiza genotipică permite:

- studiul structurii genei;
- stabilirea hărţii complete a genomului uman; elucidarea mecanismelor de expresie genică şi în special a modalităţilor de reglaj, cheia unor procese biologice fundamentale: diferenţierea celulară, morfogeneza, senescenţa, funcţia sistemului nervos sau a sistemului imun.

În *medicina practică* analiza genotipică este folosită pentru:

- studiul patologiei moleculare produsă de mutaţiile ADN, indiferent dacă este vorba de o patologie ereditară (boli genetice) sau somatică (cancere);
- diagnosticul genotipic prenatal sau presimptomatic al unor boli chiar şi atunci când gena şi efectele ei nu sunt cunoscute sau nu sunt evidente;
- recunoaşterea unei infecţii virale latente.

Pentru a identifica şi studia o genă dintr-o colecţie (bibliotecă/bancă) de fragmente de ADN clonate sau pentru a pune diagnosticul molecular al unei boli la o anumită persoană este necesară o *sondă genotipică* adecvată care să permită fie recunoaşterea directă a genei fie a unor markeri genotipici (secvenţe necodante) situaţi în vecinătatea genei. Această recunoaştere se bazează pe principiul **hibridizării moleculare** a acizilor nucleici.

3.1. HIBRIDIZAREA MOLECULARĂ A ACIZILOR NUCLEICI.

Hibridizarea moleculară se bazează pe capacitatea unor *molecule monocatenare* de acid nucleic de a forma, pe bază de complementaritate, molecule *bicatenare*. *Tehnicile standard* folosesc o **sondă** monocatenară de acid nucleic (cu o structură cunoscută), pentru a identifica o secvenţă

similară într-un amestec complex şi heterogen de molecule de acid nucleic **"ţintă" (**de obicei *imobilizat* pe un suport solid). Dacă ţinta este o moleculă de ADN dublu-catenară atunci catenele trebuie mai întâi *separate* (prin încălzire sau tratament alcalin). În condiţii adecvate, sonda genotipică (vezi ***caseta 3.5***) se fixează specific şi stabil pe secvenţa sa complementară din ţintă. Pentru a *identifica* şi izola hibridul molecular *sonda este marcată* cu un trasor radioactiv sau cu un compus fluorescent. Aceasta va permite *detectarea* secvenţei / genei ce posedă o secvenţă ADN omologă sondei folosite.

Fragment ADN:
...T T A **T A C G G T C A T** C G T C G C A T G C T A G
| | | | | | | | | |
A T*G C CA*G T A
Sondă oligonucleotidică marcată cu ^{32} P (*)

Fenomenul este de o specificitate extraordinară pentru că o sondă este capabilă să recunoască o secvenţă unică printre milioane de alte secvenţe. Mai recent s-a introdus şi se foloseşte mai frecvent **hibridizarea inversă** care se deosebeşte de *hibridizarea standard* a acizilor nucleici prin faptul că sonda *nemarcată* este *fixată* pe un suport solid iar acidul nucleic "ţintă" este *marcat* şi se află într-o soluţie apoasă.

CASETA 3.5

Sondele genotipice

Prin sondă genotpică se înţelege orice secvenţă de ADN sau ARN, de cel puţin 20 nucleotide, omologă unei secvenţe celulare (de ADN sau ARN) care se hibridează în mod specific şi stabil cu aceasta, prin asociere între bazele complementare: A-T şi G-C.

Obţinerea unei sonde specifice necesită izolarea şi clonarea prealabilă a genei sau a markerului genei. De aceea există două tipuri de sonde: directe şi indirecte.

*(1) **Sondele directe** corespund genei analizate[21]. Ele sunt de mai multe tipuri: sonde pentru ADN genomic sau ADNc din băncile corespunzătoare; ribosonde (alcătuite din ARN); oligosonde de sinteză; sonde pentru ADN-ul a genomului unor microorganisme (de ex. virusul hepatitei B) atunci când se urmăreşte integrarea lor în genomul celulelor umane.*

*(2) **Sondele indirecte** sunt fragmente de ADN intergenic ce provin dintr-o bancă de ADN genomic, care pun în evidenţă polimorfismul lungimii fragmentelor de restricţie (RFLP), folosit ca marker genetic. Pentru că nu conţin o secvenţă codantă se mai numesc şi sonde anonime. Atunci când un locus este definit printr-o sondă anonimă se foloseşte o nomenclatură specială. De ex. D22S1 - unde prima literă este D (de la DNA) urmată de numărul cromosomului şi unul din următoarele simboluri: S - pentru secvenţa unică; Z - pentru secvenţă repetată situată într-un situs cromosomic definit; NF - pentru secvenţă repetitivă dar dispersată pe mai mulţi cromosomi. Ultima cifră este un număr cronologic care corespunde punerii în evidenţă.*

a). Analiza ADN genomic uman prin metoda de transfer Southern

Obiectivul principal al metodei descrisă de Ed Southern (1975) – cunoscută sub numele de **Southern blot -** este de a evidenţia, cu ajutorul unei sonde specifice prezenţa sau absenţa *unui fragment de ADN omolog ("ţintă")*, obţinut *din ADN genomic,* cu o anumită enzimă de restricţie. Pentru aceasta ADN extras din nuclii celulari este digerat cu una sau mai multe enzime de restricţie, fragmentele sunt separate după mărime prin electroforeză în gel de agaroză, denaturate şi apoi transferate (prin "sugere"/*blotting*) şi imobilizate pe o membrană solidă de nitrocelulloză, pentru a fi hibridizate cu o sondă monocatenară specifică, marcată radioactiv. Sonda se va fixa numai pe secvenţa omologă de ADN (dacă este prezentă) iar poziţia ei pe membrană va permite evaluarea mărimii sale (figura 3.21).

Metoda Southern comportă următoarele etape (figura 3.21):

[21] Denumirea sondelor directe se face cu un nume privat, dat de laboratorul inventator, precum şi prin abrevierea locusului genei (conform nomenclaturii "Human Gene Mapping"). De exemplu sonda ce corespunde genei alfa - globină se numeşte pJW 101 (denumire privată) şi HBA (în nomenclatura oficială).

- *extragerea ADN genomic* dintr-o sursă accesibilă: limfocite din sângele periferic, celule din culturi de fibroblaste, celule amniotice sau din vilozităţi coriale (pentru diagnosticul prenatal), celule obţinute prin biopsii de organe;
- *fragmentarea ADN genomic*, prin clivare cu o enzimă de restricţie adecvată (sau un amestec de două enzime), pentru a obţine circa un milion de fragmente mai mici de 20kb; aceasta presupune cunoaşterea prealabilă a *hărţii situsurilor de restricţie* pentru domeniul genomic explorat şi alegerea celui mai adecvat cuplu enzimă de restricţie - sondă.
- *separarea fragmentelor*, pe baza mărimii lor prin electroforeză în gel de agaroză, în care fragmentele mai mici migrează mai repede decât cele mai mari; pentru separarea fragmentelor mai mari de ADN (40 kb →2-3 Mb) se foloseşte electroforeza în câmp pulsatil;
- *denaturarea* (în mediu alcalin) fragmentelor bicatenare, pentru separarea celor două monocatene complementare;
- *transferarea* moleculelor de ADN monocatenar de pe gelul de agaroză fragil pe un suport *solid* (filtru din nitroceluloză sau nailon), prin capilaritate sau sugere ("blotting"); de aici derivă numele metodei "Southern blot" sau "Southern transfer"; fragmentele monocatenare de ADN vor fi *imobilizate* pe membrană în poziţia în care s-au găsit, după migrare, în gel;
- *hibridizarea* fragmentelor ADN de pe filtru cu o sondă monocatenară specifică unei gene sau a unui marker genotipic, *marcată* radioactiv; sonda se va împerechea / asocia numai cu secvenţa complementară dintr-unul sau două fragmente de ADN genomic;
- *spălarea:* hetroduplexul format de fragmentul de ADN şi sondă este puternic fixat pe filtru şi deci rezistent la o spălare intensă (care îndepărtează fragmentele nehibridate de pe filtru);
- *punerea în evidenţă* a duplexului, printr-un semnal persistent, după contactul filtrului cu un film foto (autoradiografie), care relevă poziţia şi mărimea fragmentului.

Rezultatele obţinute prin metoda Southern *se compară* cu profilul normal al domeniului genomic explorat de sondă şi astfel se pot evidenţia două tipuri de mutaţii: *deleţii sau inserţii genice de mai mult de 50-100 pb*, detectate prin modificarea lungimii fragmentelor realizate de enzima de restricţie; dacă deleţia este totală atunci gena dispare şi sonda nu dă nici un semnal; *mutaţii punctiforme*, ce afectează o singură bază şi creează sau distrug un situs de restricţie intragenic pentru o anumită enzimă, antrenând *o modificare a lungimii fragmentelor de restricţie*.

Cu toate că rezultatele obţinute prin metoda Southern par reduse ca informaţie (semnal prezent sau absent; situs prezent sau absent) analiza genotipică realizată cu această tehnică are o valoare practică, deoarece permite *diagnosticul prenatal sau presimptomatic* al unor mutaţii genice morbide, precum şi *identificarea heterozigoţilor*. Metoda Southern nu permite evidenţierea unor modificări mici din structura ADN (microdeleţii, mutaţii punctiforme ale unei pb). În aceste cazuri, sonda de ADN nu va putea face distincţie între gena normală şi gena cu alterări minime ale secvenţei nucleotidice. Trebuie să subliniem că metoda Southern are şi alte inconveniente: este laborioasă, complexă, costisitoare şi prezintă numeroase dificultăţi de interpretare.

b). Analiza cu sonde oligonucleotidice specifice unei alele (ASO).

În această metodă, o soluţie apoasă de ADN genomic *nefracţionat* este depusă sub forma unor *pete* direct pe o membrană de nitroceluloză (**dot-blot**) sau indirect printr-o *fantă* (**slot-dot**); picătura este uscată şi ADN imobilizat pe membrană este denaturat (prin tratarea filtrului cu o soluţie de alcali) şi expus la o soluţie ce conţine *sonda monocatenară marcată*; aceasta se va hibridiza, formîndu-se un heteroduplex ţintă-sondă ce va fi pus în evidenţă autoradiografic.

Această metodă, mai simplă şi mai rapidă decît Southern blot (nu necesită fracţionarea ADN), foloseşte deobicei sonde ce corespund unei secvenţe mici (20 pb) din structura genei, numite şi **sonde oligonucleotidice specifice** (ASO de la "Alelele Specific Oligonucleotides") sau pe scurt, oligonucleotide. Aceste sonde scurte sunt mult mai "sensibile" la alterările minime ale secvenţei genice, putând *depista modificări ale unei singure perechi de baze*. De aceea, ele sunt folosite pentru depistarea unor *mutaţii specifice*, cunoscute deja într-o anumită boală genetică[22]. Cu alte cuvinte, se poate stabili dacă acea *mutaţie este prezentă sau absentă într-o probă de ADN* obţinut de

[22] Există şi alte metode pentru detectarea mutaţiilor *necunoscute* : **denaturing gradient gel elctrophoresis (DGGE), mismatch cleavage, single-strand conformational polymorphism (SSCP)** care vor fi descrise în capitolul 8

la un pacient oarecare. Sensibilitatea sondelor ASO este evident superioară metodei Southern, care nu poate depista leziunile minime ale ADN.

Pentru depistarea unei mutaţii specifice se fabrică oligonucleotide specifice unei alele normale sau mutante. Mai exact, ele corespund regiunii genice unde au fost localizate diferenţe de secvenţă (mutaţii). Sonda corespunzătoare acestei regiuni este sintetizată în două versiuni: normală şi mutantă. *Versiunea normală a sondei* nu se poate hibridiza decât cu alela normală şi invers, *versiunea mutantă* se împerechează numai cu alela mutantă. Hibridizările încrucişate nu sunt stabile datorită împerecherii greşite ("mismatch") între baze necomplementare (figura 3.22). Astfel se poate stabili dacă *o mutaţie deja cunoscută*, specifică unei boli, este prezentă sau absentă la o anumită persoană. Mai mult, se poate face deosebirea între un homozigot pentru alela normală (ADN-ul său hibridizează numai cu ASO normal), heterozigot (ADN-ul său hibridizează cu ambele versiuni ASO) sau homozigot pentru secvenţa mutantă (ADN-ul său hibridizează numai cu ASO mutant).

Trebuie totuşi să subliniem că lipsa de hibridizare între versiunea ASO mutantă şi ADN pacientului nu înseamnă automat că aceasta este normal: el poate avea o altă mutaţie în genă, în altă regiune decât cea explorată printr-o anumită sondă ASO. Analiza ASO este utilă numai în cazurile în care există o mare probabilitate (bazată pe alte date) ca o familie sau un individ să posede o mutaţie cunoscută. Deci, tehnica se aplică în special pentru boli genetice caracterizate printr-un număr mic de mutaţii, precis definite (de ex. hemocromatoza, drepanocitoza).

c). Analiza ARN m prin Northern blot.

Northern blot[23] este o variantă a metodei Southern blot în care acidul nucleic ţintă este ARNm . Obiectivul principal al metodei este obţinerea de *informaţii privind profilurile de expresie (tipul celular, abundenţa transcriptului) unei anumite gene (deja clonată*).

Punerea în evidenţă a unui anumit ARN mesager se bazează pe hibridarea moleculară a ARN cu o sondă complementară monocatenară (ADN c denaturat; oligonucleotide ADN antisens).

Moleculele de ARNm, de diferite lungimi (în funcţie de gena transcrisă), extrase din diferite ţesuturi, sunt *separate* prin electroforeză în gel de agaroză denaturant (care suprimă structura secundară ce ar jena migrarea şi hibridizarea). Apoi ele sunt *transferate* pe un filtru de nitroceluloză şi *hibridate* cu o sondă de ADN marcată. Pe *autoradiogramă* se observă una sau mai multe benzi a căror talie, număr şi intensitate sunt indicaţii preţioase. Absenţa unei benzi ce ar fi trebuit evidenţiată de sondă ne indică faptul că gena nu este exprimată / transcrisă datorită unei mutaţii. Existenţa unei mutaţii (de ex., deleţie) poate fi revelată printr-un fragment de ARN m cu talie anormală.

Analiza ARN mesager este mult mai delicată şi mai dificilă decât cea a ADN deoarece: ARN este foarte vulnerabil la ARN-azele citoplasmatice; numeroase tipuri au o expresie celulară variabilă în funcţie de diferenţierea celulară[24] (de ex. ARN m pentru fenilalanin-hidroxilază nu este prezent decât în hepatocite, iar cel pentru tiroglobulină numai în celulele tiroidiene); ARNm se găseşte în cantităţi foarte mici.

c). Hibridizarea *in situ* a ADN.

Analiza ADN se poate face şi prin hibridizarea *in situ* pe preparate cromosomice în pro-metafază folosind sonde marcate (radioactiv sau cu molecule fluorescente - FISH) judicios alese, în funcţie de obiectivul urmărit (vezi capitolul 2.D.3.a). Dacă se bănuieşte o microdeleţie pentru o anumită regiune cromosomică, la limita vizibilităţii microscopice se utilizează o sondă marcată corespunzătoare genelor din regiunea respectivă; absenţa semnalului corespunzător sondei traduce deleţia regiunii. Dacă se urmăreşte localizarea unei gene se foloseşte o sondă tip ADNc pentru o genă analogă identificată deja la un animal de laborator. Hibridizarea *in situ* se foloseşte şi pentru evidenţierea ARN în secţiuni histologice folosind deobicei o sondă de ARN, marcată ("ribosondă"), complementară unui ARNm.

d). Identificarea ADN al organismelor exogene

Orice infecţie sau infestare printr-un microorganism bacterian, viral, fungic sau parazitar poate fi detectată într-un eşantion biologic prin hibridizare moleculară, dacă există sonde corespunzătoare genomului acestui organism. Hibridizarea moleculară oferă multiple avantaje faţă

[23] Metoda este denumită "Northern" (Nordică) prin opoziţie umoristică faţă de metoda descrisă de Southern ("Sudică").

[24] ADN se poate analiza în orice tip de celule nucleate şi toate genele sunt egal accesibile analizei.

de metodele clasice: simplitate, rapiditate şi specificitate (perspective de automatizare); posibilitatea de a detecta agenţi infecţioşi dificil sau imposibil de cultivat in vitro; posibilitatea de depistare directă a unui agent patogen într-un amestec polimicrobian (în mijlocul unei flore comensale) şi pe orice tip de eşantion patologic.

În practică metodele de hibridizare moleculară au găsit deja importante aplicaţii pentru caracterizarea rapidă a germenilor cu creştere lentă (mycobacterii, treponeme, Brucella etc.), pentru identificarea virusului hepatitei B, virusului papiloma (HPV) şi în special în cazurile de SIDA (HIV).

3.2. ANA LIZA SECVENŢEI NUCLEOTIDELOR DIN ADN (secvenţializarea ADN)

După izolarea şi amplificarea unui fragment de ADN (genă), etapa principală de analiză genotipică este *determinarea secvenţei nucleotidice*, deci a informaţiei genetice a fragmentului respectiv. Această acţiune este decisivă pentru a stabili *structura* genei precum şi secvenţa de aminoacizi a *proteinei* codificată de genă (în cazul în care ea nu a fost identificată). De asemenea se poate determina *tipul de mutaţie* care a produs o boală genetică. Stabilirea secvenţei nucleotidice este utilă şi pentru sinteza *oligosondelor* specifice pentru o alelă (ASO) şi a *amorselor* folosite în PCR, ambele fiind larg utilizate în diagnosticul molecular.

Metodele pentru determinarea secvenţei nucleotidice a unor fragmente de ADN au fost descoperite independent de Walter Gilbert (tehnica de degradare chimică) şi Fred Sanger (tehnica de sinteză enzimatică), care în 1980 au primit premiul NOBEL. Metoda cea mai folosită în prezent este metoda enzimatică a lui Sanger

Metoda enzimatica (Sanger)

(1). *Principiu.*

Se sintetizează o catenă de ADN complementară *fragmentului cu secvenţă necunoscută,* utilizând ADN-polimerază şi o *amorsă* radiomarcată (fixată la extremitatea 3' a fragmentului). Reacţia poate fi inhibată (stopată) în dreptul unui anumit nucleotid, prin folosirea unor *analogi nucleotidici* de tipul dideoxinucleotidelor (care au pierdut gruparea 3'-OH). ADN *polimeraza* poate adăuga un astfel de nucleotid, dar după ce acesta a fost încorporat, reacţia se opreşte datorită absenţei grupării 3'-0H din dideoxinucleotid, necesară polimerizării. Se realizează astfel fragmente cu o lungime egală distanţei dintre amorsă şi locul unde s-a incorporat un anumit dideoxinucleotid.

(2). *Descrierea metodei*:

Molecula de ADN ce trebuie secvenţializată este *separată* în cele două catene. Fiecare catenă este *clonată* într-un vector monocatenar (fagul M 13), fiind *inserată* (cu capătul 3') într-un anumit situs, după o secvenţă (primer) cunoscută şi marcată radioactiv sau fluorescent, ce are rolul de *amorsă* (figura 3.23). Aceste monocatene de ADN servesc ca *matriţă* pentru sinteza unei catene noi, complementare, folosind ADN polimeraza şi nucleotidele necesare sintezei. Reacţia se desfăşoară concomitent în *patru eprubete,* în fiecare se va stabili localizarea unui anumit nucleotid folosind ca analog inhibitor, un anumit dideoxiribonucleotid. De ex. în eprubeta ce va stabili localizarea G se va adauga ddGTP; atunci când dideoxiribonucleotidul respectiv este încorporat în catena în curs de formare, sinteza se opreşte. Când polimeraza întâlneşte următorul nucleotid C fenomenul se repetă şi rezultă un fragment cu 4 nucleotide şi respectiv 9 nucleotide[25] (figura 3.23). Apoi proba este analizată prin electroforeză în gel; se observă o serie de benzi la poziţii ce corespund localizării fiecărui nucleotid cu G. Reactii similare pentru nucleotidele cu A, T şi C vor furniza serii corespunzătoare de fragmente (fiecare probă într-un anumit "canal" al gelului de poliacrilamidă). Ansamblul celor patru reacţii poate fi atunci citit pe o "scară" poziţională direcţionată de la fragmentele cele mai mici la cele mai mari; astfel se poate determina *secvenţa* de nucleotide a fragmentului analizat.

[25] Cantităţile de nucleotide G normale şi analog G din această reacţie sunt astfel ajustate ca polimeraza să încorporeze analogul G în unele catene noi sintetizate pentru prima oară când se încorporează G, în timp ce în alte catene analogul este încorporat a doua oara când se va încorpora G, în altele a treia oară s.a.m.d

Metoda de sinteză enzimatică descrisă de Sanger este din ce în ce mai mult folosită fiind perfecţionată continuu. Folosind ca vectori, pentru secvenţa de determinat, plasmide de generaţia III-a se pot secvenţia molecule de ADN bicatenar. Marcajul radioactiv a fost înlocuit cu marcajul prin fluorocromi specifici fiecărui nucleotid. Informatizarea a deschis drumul automatizării şi sunt deja folosite primele secvenţiatoare automate. Determinarea scevenţei unui acid nucleic nu mai pune probleme şi este extrem de rapidă. În aceste condiţii a fost posibilă determinarea secvenţei cvasi- integrale a genomului uman (alcătuit din circa 3 miliarde pb).

4. METODE DE ANALIZĂ A PROTEINELOR

Analiza structurii genelor normale sau anormale trebuie completată deseori cu *studiul funcţiei sau expresiei acestor gene* la nivel de proteină. În cazul mutaţiilor genice este important de stabilit defectul molecular al proteinelor codificate şi modul în care ele produc un fenotip anormal.

a). Metoda de transfer Western.

Pentru identificarea specifică a proteinelor a fost imaginat un procedeu asemănător metodelor Southern şi Northern, botezat "Western blotting". El permite evaluarea cantitativă şi calitativă a unei proteine mutante, extrasă din celulele unor pacienţi cu boli genetice.

Proteinele *izolate* dintr-un extract celular sunt *separate*, pe baza lungimii (mărimii) lor, prin electroforeză în gel de poliacrilamidă. Apoi sunt *transferate* pe un filtru de nitroceluloză şi incubate cu un *antiser specific* pentru proteina respectivă. Complexul antigen (proteină) - anticorp (antiser) este identificat cu ajutorul unui *anti-anticorp* (anticorp ce recunoaşte primul anticorp folosit în reacţie) marcat radioactiv sau fluorescent.

Metoda Western permite diferenţierea între bolnavii cu forme grave de boală (prin absenţa totală a proteinei) şi forme medii (cantităţi mici de proteină); de ex. forma gravă Duchenne şi medie Becker a distrofiei musculare legată de X (figura 3.24). Deasemeni, se pot evidenţia heterozigoţii, purtători sănătoşi de gena mutantă (Na) care vor avea o cantitate mai redusă (la jumătate) de proteină normală comparativ cu homozigoţii sănătoşi (NN).

b). Determinarea secvenţei de aminoacizi a proteinelor

Stabilirea secvenţei de aminoacizi a proteinei este utilă atât pentru analiza şi sinteza proteinei, cât şi pentru izolarea genei corespunzătoare. Astfel, pe baza secvenţei de aminoacizi a unei părţi de proteină, se poate sintetiza (pe baza relaţiei aminoacid-codon stabilită de codul genetic) un oligonucleotid cu o secvenţă de nucleotide corespunzătoare celei de aminoacizi. Acest oligonuleotid poate fi utilizat ca sondă pentru a căuta gena corespunzătoare într-o bandă bibliotecă de ADN genomic sau ADN complementar.

Tehnicile de secvenţializare a proteinelor, introduse de Sanger în 1950 (primul premiu NOBEL luat de acest mare cercetător, de două ori laureat), constau în clivarea chimică sau enzimatică a proteinei în polipeptide mai mici (15-30 aminoacizi) care vor fi secvenţiate de analizatoare automate, începând cu capătul amino al fiecărui peptid.

c). Producţia de proteine prin "inginerie genetică".

Cu ajutorul genelor clonate în E.coli sau levuri (drojdii) se pot produce uşor, ieftin şi în cantităţi "industriale" diferite proteine de origine umană, cu valoare terapeutică.

Multe boli sunt determinate de absenţa sau pierderea funcţiei unor proteine. Cel mai adesea, tratamentul nu poate fi decât *substitutiv* şi este preferabilă administrarea unor proteine de origine umană deoarece proteinele animale sunt potenţial imunogene. Totuşi, prin metodele clasice, nu se pot obţine întotdeauna proteine umane (de ex. insulina) sau fabricarea unor cantităţi mari ridică probleme de disponibilitate şi de contaminare virală (de ex. fabricarea factorului VIII necesită sute de prelevări sanguine ce cresc riscul contaminării cu virus HBV sau HIV). În aceste condiţii, producţia de proteine de substituţie prin "inginerie genetică" este o soluţie ideală. Au fost deja fabricate şi utilizate în producţia medicală: *insulină* (pentru tratamentul diabetului), *hormon de creştere* (pentru terapia tulburărilor de creştere), *streptokinază* (substanţă trombolitică folosită în

infarctul miocardic acut), *factorul VIII* al coagulării (pentru tratamentul hemofiliei), *eritropoietină* (hormonul care stimulează proliferarea celulelor eritroide), *interferoni* (cu acţiune citostatică şi antivirală) etc. Concomitent s-a proiectat producţia unor *vaccinuri* (prin folosirea fracţiei virale proteice necesară inducerii reacţiei imune) sau bio-reactivi (proteine, enzime).

Biotehnologiile utilizate pentru producţia de proteine umane ridică totuşi diferite probleme. În cazul producţiei de către bacterii este necesară fabricarea unor *vectori de expresie bacteriană* de mare randament, găsirea unor soluţii tehnice care să evite inactivarea proteinei fabricate după inserţia vectorului ce conţine gena umană sau să permită recuperarea ei facilă din "reactoarele de cultură". Producţia bacteriană de proteine umane este valabilă numai pentru proteinele care *nu trebuie activate* prin modificări secundare (glicozilare, carboxilare etc.) după sinteză. În acest caz trebuie să se recurgă la producţia proteinei de către *celulele eucariote în cultură*, mult mai complexă şi costisitoare. Se preconizează însă soluţii mai eficace: plantele şi animalele transgenice.

5. TEHNICILE DE MODIFICARE A MATERIALULUI GENETIC.

Expresia genelor normale şi mutante precum şi fenotipul pe care-l determină se află sub controlul unor mecanisme complexe, care implică intervenţia anumitor *secvenţe de ADN*, cu rol de reglare, precum şi acţiunea unor *molecule efectoare exogene* care se fixează la ADN. Descifrarea acestor mecanisme este importantă nu numai pentru fiziologia normală ci şi pentru elucidarea patogeniei bolilor moleculare, optimizarea diagnosticului şi, mai ales, a tratamentului lor. Un pas enorm pentru înţelegerea mecanismelor de reglare a expresiei genelor şi patogeniei bolilor genetice l-a reprezentat introducerea *tehnicilor de modificare dirijată a materialului genetic.* Aceste tehnici pot crea mutante noi sau pot modula acţiunea unor componente ale sistemelor de reglare.

Practic sunt posibile două tipuri de acţiuni: modificarea unor structuri existente (mutageneză dirijată) sau crearea unor structuri noi (animale transgenice). Strategia globală implică mai multe etape:

- secvenţa nucleotidică studiată (genă sau parte de genă) va fi mai întâi *modificată* (deleţie, inserţie, substituţie de nucleotide) şi apoi *cuplată* cu altă secvenţă ADN (*"reporter"*) care va servi la identificarea ei;
- *ADN recombinant* este introdus fie în culturi de celule (transfecţie), fie în ovocite fecundate (animale transgenice);
- După obţinerea gazdelor se analizează efectele (expresia) secvenţei analizate (creşterea / diminuarea sintezei unor proteine; modificarea proprietăţilor proteinei produse) într-un context in vivo, care integrează efectele tuturor parametrilor naturali; analiza rezultatelor trebuie făcută însă cu mare *prudenţă* deoarece trebuie să se ţină cont de o serie de elemente ce nu sunt încă controlabile: localizarea şi stabilirea inserţiei, posibilitatea de a fi modificată de celule.

a). Modificarea unei secvenţe nucleotidice

Pentru a evalua *rolul unei anumite secvenţe nucleotidice* (genă sau parte de genă) se produce mai întâi *suprimarea* (excizia) ei globală, folosind enzime de restricţie; capetele moleculei ADN ce rezultă după excizie vor fi *resudate,* cu ajutorul unei ligaze. În felul acesta se pot evalua *consecinţele fiziopatologice ale absenţei secvenţei studiate*. Ulterior, pe un alt sistem experimental, se realizează în secvenţa studiată succesiv *deleţii* din ce în ce mai mici, pentru a identifica şi localiza precis *situsurile* cele mai strategice. Apoi, în aceste regiuni se induc *mutaţii* diferite pentru a preciza rolul fiecărui nucleotid din aceste regiuni asupra mecanismelor reglatoare.

b). Mutageneza inserţională aleatorie.

Această tehnică permite *evidenţierea şi clonarea unor gene necunoscute*.

O secvenţă de ADN cunoscută şi reperabilă (transposon în cazul Drosophillei şi retroviruşi la şoarece) este introdusă într-o celulă embrionară (ovocite fecundate, blastocite). Ea se încorporează *la întâmplare/aleatoriu* în genomul celular; dacă inserţia se face într-o genă se produc mutaţia ei, pierderea funcţiei proteinei codificate şi modificarea fenotipului. După selecţionarea

mutaţiilor se realizează un clonaj genomic folosind ca sondă o secvenţă identică cu cea introdusă; astfel se poate repera gena în care s-a produs inserţia.

c). Mutageneza dirijată prin oligonucleotide de sinteză

Cu ajutorul unor oligonucleotide de sinteză se pot induce *mutaţii punctiforme* într-un anumit situs din structura genei. În felul acesta se poate studia efectul precis al unui nucleotid în mecanismul reglator sau rolul unui aminoacid (codificat de un codon mutant) în secvenţa proteică. Astfel, codonul AUG (pentru metionină) din structura genei alfa-1-antitripsinei a fost modificat în două variante GUG (semnifică valina) şi AGG (pentru arginină); gena cu prima variantă produce o enzimă cu mare eficacitate (care se preconizează a fi utilizată în prevenirea bronşitei cronice la fumători) iar gena cu a doua variantă are concomitent o activitate antitrombină III.

d). Micro-injecţia de ADN în ovocite fecundate.

Această metodă de manipulare genetică a unui întreg organism reprezintă cel mai puternic instrument de analiză a mecanismelor de expresie a genelor eucariote, într-un veritabil context in vivo. Principiul metodei este simplu dar realizarea practică este delicată iar randamentul este redus (10-20%). Ea constă fie din microinjecţia unei gene în ovocite fecundate (de obicei de şoarece), care apoi sunt injectate în uterul unei femele pregătite pentru gestaţie, fie introducerea ei în celule stem embrionare, nediferenţiate, care sunt ulterior implantate într-un blastocist. În felul acesta se obţin **animale transgenice**. Dacă gena specifică a fost modificată înainte de a se introduce în celulele stem embrionare atunci animalele obţinute se numesc "**knockout".**

Analiza şoarecilor născuţi relevă, în cazurile reuşite, integrarea aleatorie a genei analizate în cromosomi. Copiile integrate sunt prezente în toate celulele şi transmise la descendenţi. Ele se exprimă deobicei în ţesutul specific (atunci când gena prezintă şi secvenţele de reglare). Experienţele realizate cu gene pentru elastază, globină, transferină, hormon de creştere etc au furnizat date preţioase pentru înţelegerea mecanismelor de expresie. Mai recent introducerea unor gene mutante cunoscute a permis crearea unor veritabile modele experimentale pentru studiul unor boli genetice umane.

D. LOCALIZAREA GENELOR PE CROMOSOMI (HARTA GENICĂ LA OM)

Localizarea unei gene pe un anumit cromosom a fost iniţial un "exerciţiu intelectual", fără consecinţe practice, determinat de curiozitatea şi dorinţa de cunoaştere a spiritului uman. Progresele remarcabile ale cartografierii genomului uman în ultimii 20 ani au generat însă *multiple aplicaţii în teoria şi practica medicală*, pentru înţelegerea mecanismelor bolilor genetice, optimizarea diagnosticului bolilor genetice (mai ales prenatal sau presimptomatic), creşterea eficenţei sfatului genetic (ce stabileşte riscul de apariţie sau reapariţie a bolii) şi eventual pentru tratamentul bolilor gentice, prin terapie genică (prin inserţia unei gene normale la indivizii afectaţi de o boală genetică). În aceste condiţii, realizarea unei **hărţi complete a genomului uman**, un fel de *"enciclopedie a tuturor genelor noastre şi bolilor genetice asociate lor"* este obiectivul central al geneticii medicale.

Cartografierea genelor pe cromosomii umani se poate realiza în două variante: cartografierea genetică şi cartografiera fizică.

- **Cartografierea genetică** reprezintă evaluarea tendinţei ca două gene (una dintre ele fiind o genă marker) să segrege împreună în meioză şi să se transmită *înlănţuite* de la părinţi, prin gameţi, la descendenţi. **Harta genetică** este o reprezentare a poziţiei relative a genelor pe un cromosom, bazată pe *frecvenţa de recombinare meiotică* între două segmente de ADN. Se realizează astfel *"o hartă de înlănţuire".* În acet caz este vorba mai mult de o descriere a comportării meiotice a genelor decât de o localizare fizică.
- **Cartografierea fizică** constă în *localizarea fizică reală a genelor* într-o anumită regiune a unui cromosom, folosind anumiţi markeri. Cu ajutorul unor metode de analiză cromosomică şi

moleculară, *poziţia* unor gene este descrisă în unităţi determinate prin măsurători fizice ale distanţelor dintre markeri. Se realizează astfel *hărţi cromosomice* pe baza cărora se obţin hărţile ADN (pentru o regiune din cromosom). **Harta fizică** *este reprezentarea poziţiei reale a genelor în ADN al fiecărui cromosom,* într-o anumită ordine şi la distanţe cunoscute (măsurate în perechi de baze). Obiectivul final al cartografierii fizice este stabilirea integrală a secvenţelor nucleotidice liniare din fiecare cromosom.

Înainte de anul 1950 localizarea genică era limitată exclusiv la cromosomul X, deoarece analiza genealogică evidenţia o transmitere ereditară caracteristică, ce permitea localizarea genei reaspective[26]. Genele autosomale erau mult mai dificil de cartografiat. Prima genă autosomală localizată a fost a grupei sanguine Duffy (Donahue, 1968) care, într-o anumită familie, era transmisă împreună cu alungirea constricţiei secundare subcentromerice de pe braţul lung al cromosomului 1. După 1970 studiile genealogice, lungi şi dificile, au fost înlocuite cu analiza segregării cromosomilor în celulele somatice în cultură. S-a născut astfel **genetica celulelor somatice** ce reprezintă o posibilitate originală de a studia bolile monogenice şi cromosomice în culturi celulare (fibroblaste) pe termen lung. Foarte curând s-au realizat *hibrizi celulari interspecifici* şi localizarea genică a devenit mai accesibilă. Totuşi cartografierea genelor în genomul uman a progresat lent deoarece se foloseau *markeri fenotipici* (de ex., diferite proteine) iar numărul lor era mic. Întroducerea *hibridizării moleculare* cu sonde ADN a relansat cartografierea genomului uman întrucât *markerii genotipici* au o foarte mare specificitate (prin multitudinea şi polimorfismul lor) şi permit identificarea genelor, indiferent dacă ele se exprimă sau nu. Se dezvoltă concomitent tehnicile de clonare moleculară şi secvenţiere.

În 1990 a fost lansat "**Proiectul Genom uman**" al cărui obiectiv final este ca până în 2005 să descifreze complet harta genică la om sau mai precis secvenţa celor 3 miliarde de pb ce alcătuiesc genomul uman. Primele realizări, bazate pe clonare poziţională, au fost localizarea genelor pentru distrofia musculară Duchenne (1986), fibroza chistică (1990); realizarea primei hărţi genetice (bazată pe microsateliţi) în 1996, a schitei primei hărţi fizice de înaltă rezoluţie (2000) şi secvenţierea completă a cromosomilor 22 (în anul 1999), 21 (în anul 2000) şi 20 (în anul 2001) iar în februarie 2001 a fost publicată **prima schiţă (ciornă) a secvenţei genomului uman** (vezi capitolul 2.C.2), care va fi finalizată în 2003.

1. CARTOGRAFIEREA GENETICĂ

Cartografierea genetică constă în măsurarea distanţei dintre locii genetici prin studiul *fenomenelor de înlănţuire şi recombinare genică* (prin încrucişare cromosomică sau crossing over) care au loc în meioză.

1.1 ANALIZA DE ÎNLĂNŢUIRE

Două gene (loci) pot fi situate pe cromosomi diferiţi sau pe aceeaşi pereche de cromosomi omologi. În primul caz, când cei doi loci [de ex. D şi M] sunt situaţi pe *cromosomi diferiţi* (vezi figura 3.2), genele alele Dd si Mm *segregă independent* în meioză formând patru tipuri de gameţi: DM, Dm, dM şi dm, în proporţii egale (25%). În al doilea caz, când locii D şi M sunt situaţi pe *aceiaşi pereche de omologi*[27] comportarea lor în meioză depinde de *distanţa dintre loc.* Deşi am discutat această problemă în capitolul 3.A.2, reamintim două noţiuni esenţiale.

[26] Prima localizare genică pe un cromosom a fost făcută la om în 1911 când s-a demonstrat că o boală "cecitatea pentru culori" (daltonismul) se transmite ca un caracter legat de X.

[27] Combinaţia de alele de pe fiecare cromosom se numeşte **haplotip** (de la "*haploid genotyp")*

(1) Dacă cei doi loci D şi M sunt situaţi foarte aproape unul de altul (figura 3.3. a), ei au *tendinţa* de a se transmită *împreună*, formând două tipuri de gameţi DM şi dm. Acest fenomen a fost numit **înlănţuire genică** (linkage)
(2) Dacă locii D şi M se află la distanţă mai mare unul de altul (figura 3.3.b), între ei se poate produce aleatoriu o încrucişare cromosomică sau **crossing over** (CO). La locul de contact, cromatidele se rup şi schimbă segmente egale de material genetic; genele alele Dd şi Mm pot forma combinaţii noi, rezultând patru tipuri de gameţi: doi *nerecombinaţi* (DM şi dm) şi doi *recombinaţi* (Dm şi dM)[28]. Acest fenomen a fost numit **recombinare genică omologă**;

Distanţa genetică care separă doi loci situaţi pe acelaşi cromosom este *constantă* şi *independentă* de natura alelei şi familia studiată. Ea influenţează însă *frecvenţa recombinărilor*: cu cît distanţa este mai mare cu atât probabilitatea unui eveniment recombinaţional creşte şi invers.

In figura 3.25, mama (I-1) suferă de *neurofibromatoză* (NF1), boală autosomal dominantă (vezi capitolul 11.E.1), şi este heteozigotă atât pentru locusul-boală (Dd) cât şi pentru doi loci marker 1 şi 2 (Aa şi Bb); tatăl neafectat este homozigot pentru toţi cei trei loci (dd, AA şi BB). Pacienta are şase copii din care II-1, II-2 sunt bolnavi; ei au moştenit alela A a markerului 1 (care nu apare la descendenţii sănătoşi, toţi cu alela a) şi se poate presupune că alela A este înlănţuită cu alela D (boală).
Se observă că toţi cei şase copii sunt nerecombinanţi pentru NF1 şi locusul marker 1 (situaţi foarte aproape unul de altul). Totuşi II-1, II-3 şi II-5 sunt *recombinanţi pentru* NF1 şi locusul marker 2, situaţi la distanţă unul de altul. Copilul II-6 a moştenit alela A şi deci foarte probabil şi alela mutantă D dar boala nu este încă manifestă (diagnostic presimptomatic).

Distanţa genetică între doi loci se poate măsura evaluând **frecvenţa (fracţia) de recombinare;** ea este definită prin *proporţia descendenţilor recombinanţi în raport cu numărul total de descendenţi* şi este notată cu litera grecească teta (θ). Unitatea de măsură a distanţei genetice dintre doi loci a fost denumită **Morgan** (M) în onoarea lui T.H.Morgan, care a descoprit (1910) fenomenul de crossing over. Un centiMorgan (*cM*) *este o distanţă genetică în care se produc recombinări cu o frecvenţă de 1%.* Când locii sunt *complet înlănţuiţi* ei sunt situaţi foarte aproape unul de altul, nu pot fi separaţi niciodată prin CO, *nu există nici o recombinare* (θ = 0.0) iar distanţa genetică este nulă, zero cM. Când doi loci sunt *neînlănţuiţi* ei *segregă independent* în meioză (fiind localizaţi pe cromosomi diferiţi sau pe acelaşi cromosom dar la distanţă unul de altul, în grupe de înlănţuire diferite) frecvenţa de recombinare este maximă 50 %; atunci teta θ = 0.5, iar distanţa genetică este ≥ 50 cM.

Distanţa genetică dintre loci este o evaluare funcţională care nu se suprapune exact cu distanţa fizică ce-i separă. Totuşi se poate face *conversia* distanţei genetice (definită prin frecvenţa de recombinare) în distanţa fizică reală (lungimea ADN exprimată în pb)[29] S-a stabilit astfel că **1 cM este egal cu 10^6 pb** sau 1000 k.b Un cromosom cu 1-3 recombinări per meioză prezintă deci 100-300 cM. Astfel se poate construi o **hartă de înlănţuire** pentru fiecare cromosom.

Echivalenţa 1 cM = 10^6 p.b. nu este totdeauna valabilă deoarece *frecvenţa de recombinare nu este constată în lungul unui cromosom, la cromosomi deferiţi şi la sexe diferite*. Astfel,

- telomerele au recombinări mai frecvente decât altele alte regiuni cromosomice (de ex. centromerele);
- frecvenţa CO şi numărul recombinărilor este mai mare la femeie decât la bărbat;
- unii cromosomi (de ex. 12 si 13) sunt genetic "mai lungi" la femeie deşi lungimea fizică este aceeaşi ca şi la bărbat (figura 3.26).

---

[28] CO nu produce obligator o recombinare deoarece dacă între doi loci are loc un *crossing over dublu* nu rezultă recombinanţi,

[29] Deoarece analiza cromosomilor umani în profaza meiozei I (celule diploide) relevă existenţa a circa 60 de chiasme (presupuse a fi locul unde se produce CO) se consideră că "lungimea genetică" a genomului uman haploid este de 30 M sau 3000 cM. Întrucât el are $3x10^6$ pb rezultă că 1 M reprezintă 10^8 p.b. iar 1 cM un milion pb (10^6) sau 1000 de Kb[29]. În realizarea conversiei se pleacă de la ipoteza că: (1) recombinările survin cu o probabilitate egală în orice punct din cromosom sau genom; (2) se produc cu o frecvenţă egală la cele două sexe; (3) nu se interferează între ele.

Centi-Morganul este un etalon "elastic" ce poate varia între $5x10^5$ şi $1x10^7$ p.b.; acest lucru este important de ştiut pentru fiabilitatea diagnosticului genotipic indirect prin RFLPs.

Măsurarea frecvenţei de recombinare este cunoscută sub numele de **analiză de înlănţuire genetică** (linkage analysis). Ea se poate face numai prin **studii familiale**, *comparând genotipurile urmaşilor cu cele ale părinţilor*. Analiza de înlănţuire reprezintă o metodă valoroasă de *cartografiere* a unor gene, deoarece permite stabilirea poziţiei unor gene (loci) pe acelaşi cromosom (fenomen numit **sintenie**), a ordinii şi distanţei dintre ele. Se va obţine astfel o **harta genetică** *ce cuprinde poziţia relativă pe cromosom a unor gene, bazată pe frecvenţa de recombinare dintre loci* (figura 3.26).

Analiză de înlănţuire genetică se bazează pe *studiul segregării* (distribuţiei) în familie a unei *gene mutante* (cauzatoare de boală) şi a unui **marker genotipic,** un locus care "*marchează cromosomul*", ce va fi transmis prin gameţi la descendenţ, şi pe care se găseşte alela-boală (markerul nu are nici o legătură cu cauza reală a bolii genetice). Locii markeri folosiţi pentru cartografiere trebuie să fie: *codominanţi* (pentru a permite diferenţierea dintre homozigoţi şi heterozigoţi); *numeroşi şi distribuiţi* în toate regiunile fiecărui cromosom (pentru a fi cât mai aproape de locusul boală); *foarte polimorfici,* pentru ca părinţii să fie heterozigoţi pentru un marker.

Pentru analiza de înlănţuire a doi loci – boală şi marker - sunt necesare două condiţii:

- *familia studiată să fie informativă pentru locii cercetaţi*, deci părinţii trebuie să fie *heterozigoţi* atât pentru locusul-boală (morbid) cât şi pentru locusul-marker Locii cei mai "informativi" sunt cei care au un *polimorfism* ridicat (prezintă numeroase variante alelice) şi deci se găsesc în stare heterozigotă la un număr mare de persoane din populaţie; această condiţie este îndeplinită "cu brio" de markerii ADN (RFLPs, minisateliţi, microsateliţi).
- a doua condiţie este *cunoaşterea fazei de înlănţuire,* deci a modului de dispunere a alelelor celor doi loci pe un cromosom, la fiecare părinte; alele unor loci situate pe acelaşi cromosom sunt în faza *cis* sau *de cuplare* iar alele situate pe cromosomi omologi sunt în faza *trans* sau de *repulsie* (figura 3.7).

De aceea pentru studiile de înlănţuire sunt foarte utile *familiile mari,* cu trei sau mai multe generaţii (deci un număr mare de "meioze" pentru a stabili mai precis numărul de recombinanţi) şi *informative* prin markerii utilizaţi, care trebuie să permită *stabilirea fazei de înlănţuire* (figura 3.27). Dacă cunoaştem faza de înlănţuire analiza este mai eficientă deoarece este mai uşor să se determine *care descendenţi sunt recombinanţi* (pentru aceasta cel puţin un părinte trebuie să fie heterozigot). Dacă studiile pe familii mari nu sunt posibile atunci se vor folosi în cercetare *mai multe familii mici*, afectate de aceeaşi boală, produsă de aceeaşi genă mutantă (deci fără heterogenitate genetică; vezi capitolul 4.A.), iar datele vor fi *analizate statistic* (vezi scorul LOD).

Analiza de înlănţuire este utilă în genetica medicală pentru identificarea şi localizarea genelor responsabile de producere bolilor ereditare, mai ales în situaţiile în care nu se cunoaşte efectul lor biochimic. Această analiză permite *detectarea prezenţei unei gene mutante* prin urmărirea transmiterii în familie a unei *gene (locus) marker*. Aşa cum am mai spus acesta "markează" cromosomul cu alela-boală care va fi transmis, prin gameţi de la părinţi la descendenţi; deci markerul nu are nici o legătură cu cauza reală a bolii genetice. Prin analiza de înlănţuire se poate face un **diagnostic presimptomatic** deci se poate pune în evidenţă existenţa genei mutante în familiile în care gena nu se exprimă fenotipic ca urmare a lipsei de penetranţă, a manifestării tardive (vezi figura 3.25, copilul II-6) etc. sau analiza se face prenatal (figura 3.11).

1.2 DEZECHILIBRUL DE ÎNLĂNŢUIRE ŞI CARTOGRAFOEREA GENICĂ.

Aşa cum am precizat la începutul acestui capitol (vezi A.2.3), **dezechilibrul de înlănţuire** este o asociere preferenţială a unei alele a unui locus cu o anumită alelă a unui locus vecin. De ex., la 78% din bolnavii cu hemocromatoză se întâlneşte alela A3 a locusului HLA în timp ce frecvenţa ei la persoanele sănătoase este de numai 27%. Pe baza acestei înlănţuiri genetice s-a localizat gena hemocromatozei (HFE) într-o regiune de cîţiva cM pe cromosomul 6p;

ulterior analiza dezechilibrului de înlănţuire a "îngustat" regiunea cercetată la 250 k.b. şi a permis apoi identificarea genei HFE, în care o singură mutaţie (ce interesează codonul 282, numită C282Y) se găseşte la 85% din bolnavi. Aceasta s-a produs pe un cromsom ca avea alela HLA A3.

Fenomenul de dezechilibru de înlănţuire se explică prin înlănţuirea strânsă dintre cei doi loci şi prin faptul că posesorii lor au un strămoş comun. Deoarece dezechilibrul de înlănţuire este rezultatul distanţei dintre loci el a fost folosit pentru stabilirea oridinii genelor în cromosomi. În plus, dezechilibrul de înlănţuire reflectă recombinările care au avut loc în zeci de generaţii antreioare[30] (zeci de meioze fără CO, fapt ce permite localizarea genei într-o regiune mai mică de 0,1 cM.

1.3. DETERMINAREA SEMNIFICAŢIEI REZULTATELOR ANALIZELOR DE ÎNLĂNŢUIRE: SCORUL LOD.

Pentru a evalua rezultatele obţinute prin analiza de înlănţuire a unei /unor familii se determină *probabilitatea relativă de obţinere a datelor observate,* folosind un procedeu de calcul statistic, elaborat în 1955 de către Morton. El determină **raportul de probabilitate** a frecvenţei de recombinare (θ) în două ipoteze opuse:

- *există înlănţuire* iar θ < 0.5, având o anumită valoare (de ex., 0.1); probabilitatea acestei ipoteze este simbolizată prin **L(θ)**;
- *nu există înlănţuire* şi θ = 0.5; probabilitatea acestei ipoteze se notează cu **$L(\theta_{0.5})$**.

Probabilitatea relativă la o anumită valoare a lui θ (de ex., 0.1) este egală:

$$\frac{\text{probabilitatea datelor dacă locii sunt înlănţuiţi la valoarea 0.1 a lui teta}}{\text{probabilitatea datelor dacă locii sunt neînlănţuiţi}} = \frac{L(\theta)}{L(\theta_{0.5})}$$

Pentru a facilita calculul se foloseşte *logaritmul zecimal al probabilităţilor* relative (deci al raportului de probabilitate) sau **scorul LOD**[31] simbolizat prin **Z(θ)**:

$$Z(\theta)= \log_{10} [L(\theta)/L(\theta_{0.5})]$$

unde L(θ) este probabilitatea unei familii de a *prezenta înlănţuire* la o anumită valoare θ (de ex., 0.1) iar $L(\theta_{0.5})$ este probabilitatea *absenţei înlănţuirii*. Folosirea logaritmilor permite ca datele obţinute de la diferite familii să fie combinate prin simplă adiţie.

Pentru analiza de înlănţuire în familiile mici, probalităţile se calculează pe baza distribuţiei binomiale a probabilităţii:

$$Z(\theta)= \log_{10} [\theta^R(1- \theta)^{NR}] / 0.5^{NR+R},$$

unde R este numărul de recombinanţi şi NR este numărul de nerecombinanţi. Probabilitatea unei înlănţuiri [L(θ)] este egală cu $\theta^R(1- \theta)^{NR}$ iar probabilitatea absenţei înlănţuirii $[L(\theta_{0.5})]$ este egală cu 0.5^{NR+R}. Dacă de ex., din patru descendenţi unul singur este recombinant scorul LOD se calculează, pe baza formulei de mai sus, în felul următor:

$$Z(\theta)= \log_{10} [\theta^R(1- \theta)^{NR}] / 0.5^{NR+R} = \log_{10} [\theta^1(1- \theta)^3] / 0.5^{3+1}$$

Pentru o frecvenţă de recombinare θ=0.1, calculul scorului este:

$$Z(0.10)= \log_{10} [0.10^1(0.90)^3] / 0.5^4 =0.067$$

Scorurile LOD sunt calculate deobicei pentru *mai multe valori arbitrare ale lui θ.* Scorul LOD la θ=0.5 va fi totdeauna egal cu zero; un scor LOD mai mare decât 0 este o dovadă în favoarea înlănţuirii, în timp ce un scor LOD mai mic de 0 (deci negativ) pledează contra înlănţuirii. Cel mai bun scor este dat de valoarea maximă a lui Z. Valoarea lui θ la care Z este cel mai mare (Z max) este o estimare bună a fracţiei de recombinare şi se numeşte *estimarea probabilităţii maxime* ("maximum likelihood estimate"). Valorile pozitive ale lui Z sugerează ca doi loci sunt înlănţuiţi iar cele negative fac puţin probabilă o înlănţuire (la acea valoare a lui θ). Prin convenţie, *un scor LOD*

[30] Dezechilibrul de înlănţuire poate fi totusi influenţat de o serie de forţe evolutive: selecţia naturală, deriva genetică (vezi capitolul 7)

[31] LOD este un acronim de la "logaritm of odds", deci logaritm al raportului de probabilitate.

combinat care este egal sau mai mare de +3 (echivalent cu o probabilitate mai mare de 1000:1 în favoarea înlănţuirii) este considerat că o probă definitivă ca doi loci sunt înlănţuiţi (distanţa de recombinare este mai mică 50 cM). Rezultatele între 1 şi 3 sunt ambigue şi pentru o concluzie finală este necesară creşterea numărului de familii analizate. *Un scor LOD mai mic de -2 este considerat o probă că nu există înlănţuire* (probabilitate mai mare de 1000 :1 contra înlănţuirii.)

Uneori analiza de înlănţuire efectuată în mai multe familii produce un scor LOD total zero; dar în unele familii scorul LOD este pozitiv (indicând înlănţuire) iar în altele este negativ (pledând contra înlănţuirii). În aceste situaţii se suspectează o **heterogenitate de locus** (vezi capitolul 4.A) deci *mutaţii în loci diferiţi produc aceeaşi boală* (de ex., *Osteogenesis imperfecta* poate fi produsă fie de mutaţii pe cromosomul 7, fie de mutaţii pe cromosomul 17).

Calculul "scorului LOD" este complex şi în prezent se realizează pe microordinatoare cu ajutorul unor programe informatizate speciale (de ex. LIPED sau LINK-MAP).

1.4. HĂRŢILE DE ÎNLĂNŢUIRE GENETICĂ

Localizarea unei gene ce produce o anumită boală începe cu studiul unor familii în care se manifestă boala. Apoi se va analiza la membrii acestor familii distribuţia bolii şi a unor loci markeri multipli pentru fiecare cromosom, urmărind stabilirea unei înlănţuiri genice dintre gena boală şi un anumit marker (un scor LOD pozitiv). Din cauza mărimii genomului uman trebuie testaţi sute de markeri, bine aleşi, pentru a găsi o înlănţuire. Pentru a fi utili în cartografiere locii markeri de înlăţuire trebuie să fie, aşa cum am precizat, *codominanţi, numeroşi şi distribuiţi* în toate regiunile fiecărui cromosom şi *foarte polimorfici*; gradul înalt de polimorfism creşte probabilitatea ca familiile să fie informative (cu părinţi heterozigoţi pentru un marker) şi face posibilă stabilirea fără dificultăţi a fazei de înlănţuire, precum şi identificarea persoanelor recombinante din familie. Izolarea şi cartografierea a peste 10.000 de markeri polimorfici ai ADN (majoritatea microsateliţi) a condus la stabilirea unor hărţi genetice din ce în ce mai detaliate, cu o densitate sub 1cM (figura 3.29).

2. CARTOGRAFIEREA FIZICĂ

Cartografierea fizică se realizează în principiu în două mari etape: *localizarea fizică* globală a unei gene sau secvenţe de ADN pe un anumit cromosom şi apoi *localizarea regională,* din ce în ce mai precisă pe acel cromosom. Metodele de realizare a cartografierii fizice sunt variate iar nivelul lor de rezoluţie în localizarea genică este cuprins între un cromosom întreg şi o singură pereche de baze (tabelul 3.3.). Pentru ca o localizare să fie validată ea trebuie confirmată prin cel puţin două metode şi de către două echipe diferite.

Tabel 3.3. Metode folsite pentru cartografierea fizică
(după Thompson et al., 1991)

Metoda	Obiectiv	Rezoluţie de cartografiere (p.b.)
Hibrizi celulari om/rozătoare	Localizare cromosomică	50-250 x 10^6
Translocaţii, deleţii	Localizare regională	5-20 x 10^6
Dozaj genic	Localizare regională	5-20 x 10^6
Hibridare în situ	Localizare într-o bandă cromosomică	1-2 x 10^6

Hărţi de restricţie	Localizare genică	10^5 - 10^6
Clonare în cromosomi artificiali de levuri(YACs)	Clonare genică (la scară mare)	10^5 - 10^6
Clonare în E. Coli (BACs) sau PACs	Clonare genică (la scară mică)	10^3-5 x 10^6
Secvenţializare ADN	Secvenţă nucleotidică	1

1.1 HIBRIZI CELULARI SOMATICI INTERSPECIFICI

Hibrizii celulari somatici interspecifici sunt produşi prin fuziunea celulelor provenite de la specii diferite: om - şoarece sau om - hamster, realizată în culturi celulare, într-un mediu selectiv (figura 3.30).

Fuziunea celulelor somatice este facilitată de polietilen glicol sau de virusul Sendai inactivat. Se formează **heterocarioni** dacă fuzionează două celule de la specii diferite sau **homocarioni** dacă se produce fuziunea a două tipuri celulare ale aceleiaşi specii. În ambele situaţii nucleii sunt iniţiali menţinuţi separaţi în aceeaşi citoplasmă. După prima diviziune celulară mitotică cei doi nuclei *fuzionează* formând un nucleu hibrid. Izolarea clonelor celulare hibride este posibilă prin folosirea unui mediu selectiv,[32] care elimină celulele parentale nefuzionate sau homocarionii.

Pentru motive neclare, hibrizii obţinuţi au tendinţa să piardă preferenţial (în cursul primelor diviziuni) majoritatea cromosomilor umani dar să reţină cromosomii rozătoarelor. După câteva generaţii se formează *clone celulare stabile*, ce păstrează fiecare anumiţi cromosomi umani (identificaţi precis prin marcajul lor individual). Rezultă un set ("*panel*" în engleză) de clone de hibrizi care se deosebesc prin numărul si combinaţia de cromosomi umani reţinută. Acest set / "panel" de clone hibride poate fi utilizat pentru cartografierea genică (tabelul 3.4).

Principiul de bază este următorul: o genă sau o secvenţă genică particulară este prezentă[33] totdeauna într-un hibrid atunci când cromosomul pe care este localizată gena este prezent şi este absentă atunci când acest cromosom este absent din hibrid; deci *o genă care este totdeauna asociată cu prezenţa unui anumit cromosom uman într-un hibrid celular se află localizată pe acest cromosom*.

Practic, se stabileşte prezenţa sau absenţa unei gene umane într-un *set (panel) de clone de hibrizi celulari interspecifici*. Apoi se corelează prezenţa sau absenţa genei cu tipul cromosomilor umani din fiecare clonă hibridă. Analiza de concordanţă permite localizarea genei pe un anumit cromosom.

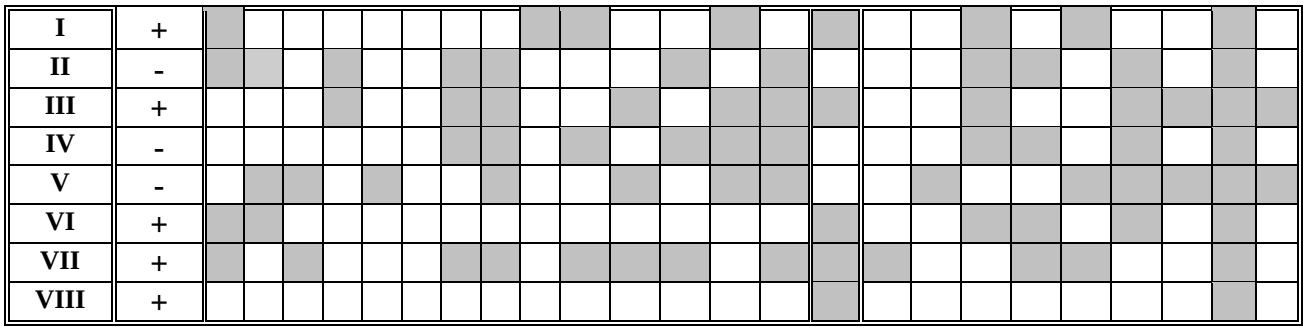
Un exemplu convingător este prezentat în tabelul 3.4. Un set de opt clone hibride om/şoarece, fiecare având 2-13 cromosomi umani, a fost folosit pentru a testa prezenţa sau absenţa genei pentru hexosaminidaza A (HEXA). Deficienţa / absenţa enzimei lizozomale HEXA produce prin acumularea gangliosidului GM2 în special în neuroni boala Tay-Sachs, caracterizată printr-o deteriorare severă mintală şi fizică, letală la 2-3 ani. Există o corelaţie perfectă între prezenţa sau absenţa genei HEXA şi prezenţa sau absenţa cromosomului 15; aceste rezultate permit localizarea genei HEXA pe cromosomul 15.

Tabelul 3.4. Localizarea genei umane HEXA folosind hibrizi celulari somatici

HIBRID	GENA HEXA	Cromosomi Umani																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y

[32] Se foloseşte frecvent mediul HAT (ce conţine hipoxantină, aminopterină, timidină) + oubainã; HAT distruge celulele de rozătoare nehibridizate iar oubainã distruge celulele umane nehibridizate.

[33] Prezenţa unei gene poate fi evidenţiată cu ajutorul unor markeri fenotipici (proteina/ enzima codificată de genă şi identificată prin electroforeză sau cu metode imunologice) sau genotipici (secvenţe de ADN identificate prin metoda Southern). Folosirea sondelor ADN şi markerilor genotipici permite identificarea unor gene care nu se exprimă de obicei în fibroblaste dar sunt prezente în cromosomii hibridului.



Puterea de rezoluţie a localizării genice prin metoda clasică a hibrizilor celulari interspecifici este "*cromosomul*". Această metodă se foloseşte la determinarea *sinteniei* dintre gene (prezenţa lor pe acelaşi cromosom) şi localizarea unui grup de înlănţuire pe un anumit cromosom. Informaţia este preţioasă pentru cartografiere dar nu dă relaţii privind cât de apropiate sau depărtate sunt genele pe cromosom şi nici care este localizarea lor regională.

Puterea de rezoluţie a metodei clasice poate fi amplificată dacă se realizează hibrizi în care celulele umane prezintă anomalii de structură cromosomice (translocaţii, deleţii, duplicaţii) spontane *localizate într-o anumită regiune cromosomică* sau hibrizi cu *fragmente de ADN* cromosomic generate prin iradiere (*"radiation hybrids"*). Atunci se poate realiza o *localizare genică subcromosomală*, într-o anumită regiune cromosomică prezentă la hibrid.

1.2. DOZAJUL GENIC

Prin această metodă localizarea unei gene pe un cromosom se face determinând diferenţele cantitative de "dozaj" ale produsului genei pe clone celulare ce conţin un număr diferit de exemplare ale unui anumit cromosom.

Iniţial metoda dozajului genic a fost utilizată pentru localizarea unor gene *pe cromosomul 21*, evaluând nivelul activităţii unei enzime (de ex. SOD-1) pe linii celulare de la pacienţii cu sindrom Down (trisomie 21, deci trei "doze") şi de la persoanele normale (două "doze"). Evidenţierea unui nivel de 150 % în primul caz şi 100 % în al doilea permite localizarea genei enzimei pe cromosomul 21. Ulterior metoda a fost folosită pentru localizarea genică într-o anumită *regiune cromosomică* examinându-se un lot de pacienţi care datorită unor anomalii cromosomice structurale prezentau trisomie parţială (trei exemplare) sau monosomie parţială (un exemplar) pentru un anumit segment cromosomic. Deasemeni a fost studiată localizarea unor gene sau secvenţe de ADN pe cromosomul X folosind clone celulare cu 1, 2, 3 sau 4 cromosomi X, provenite de la o persoană 49,XXXXY. ADN din aceste clone a fost analizat prin metoda Southern, folosind o sondă marcată corespunzătoare genei studiate. Intensitatea semnalului va fi proporţională cu numărul cromosomilor X; dacă gena este situată pe autosomi toate clonele vor genera acelaşi semnal.

1.3. CARTOGRAFIEREA PRIN ANOMALII CROMOSOMICE

La unii bolnavi cu afecţiuni monogenice se pot întâlni, cu totul întâmplător, diferite anomalii cromosomice structurale. Corelaţia dintre fenotip (boală) şi tipul specific de aberaţie cromosomică poate oferi indicaţii privind localizarea genelor mutante în anumite regiuni / benzi cromosomice.

Un exemplu "clasic" şi demonstrativ îl reprezintă *femeile* cu **miopatie Duchenne**, situaţie foarte rară şi surprinzătoare ţinând cont că boala se transmite recesiv legat de X (în care de regulă bolnavii sunt de sex masculin). Studiile citogenetice la aceste bolnave au evidenţiat existenţa unor *translocaţii X-autosom sau a unor deleţii* ce implică totdeauna banda Xp21. Pe această bază s-a concluzionat că gena implicată în producerea miopatiei Duchenne ar putea fi localizată în această bandă.

Studiul *microdeleţiilor* s-a dovedit extrem de util în cartografierea regională a anumitor gene mutante. Un alt exemplu demonstrativ îl reprezintă localizarea prin analiză citogenetică a genei

retinoblastomului în banda 13q14. Analiza cromosomică a unor bolnavi cu retinobastom unilateral asociat cu retard mintal şi diverse malformaţii congenitale (asociere destul de rară pentru retinoblastom) a evidenţiat deleţii ale braţului lung al cromosomului 13. Regiunea care este pierdută prin deleţie variază de la un pacient la altul dar interesează totdeauna banda 13q14. În această regiune mică (numită generic "*SRO*" de la "*Smallest Region of Overlap*") a fost localizată şi apoi identificată gena retinoblastomului.

1.4. HIBRIDIZAREA ÎN SITU

Hibridizarea în situ (Gall şi Pardue, 1969) este o *metodă directă* de localizare a unei gene *deja identificate şi clonate*.

O secvenţă de ADN clonat (*sondă*) se hibridizează pe cromosomii prometafazici etalaţi pe o lamă microscopică şi denaturaţi în prealabil (pentru ca ADN lor să devină monocatenar). *Sonda marcată* cu un trasor radioactiv (tritiu) - numită sondă "caldă" se fixează pe regiunea complementară de ADN, situată într-o anumită regiune a unui cromosom. Hibridul poate fi localizat prin acoperirea preparatului cu o emulsie sensibilă la razele X. Poziţia granulelor "radioactive" pe o anumită bandă cromosomică reflectă localizarea genei. Mai recent se folosesc sondele "reci" marcate cu biotină şi identificate cu o moleculă fluorescentă (streptavidină) ce se leagă la biotină; metoda este mai sensibilă şi mai rapidă decât cea care foloseşte sonde radioactive. Deoarece foloseşte un semnal fluorescent această metodă se numeşte **FISH** (Fluorescence in Situ Hibridization) (vezi capitolul 2.D.3.a).

Nivelul de rezoluţie al localizării corespunde unei regiuni de 1-2 milioane p.b. din cromosomul metafazic. Rezoluţia creşte la 50-500 kb pentru fibrele de cromatină interfazică şi la cîteva kb pentru fibre de cromatină alungite /întinse artificial ("*fiber-FISH*")

1.5. IZOLAREA UNOR CROMOSOMI INDIVIDUALI PRIN *CITOMETRIE DE FLUX*

Anumiţi cromosomi umani pot fi izolaţi într-o formă pură, unici sau în grupe, funcţie de mărime, prin citometrie de flux *f* (*low cytometry*). Ei vor fi folosiţi pentru a realiza hibrizi om-hamster (pentru studii de localizare genică) sau utilizaţi în diferite studii moleculare, pentru determinarea secvenţei de nucleotide (au fost creiate *biblioteci de ADN pentru fiecare cromosom*).

În acest proces, cromosomii umani sunt izolaţi dintr-o celulă în diviziune şi apoi marcaţi cu un colorant fluorescent ce se fixează pe ADN; fiecare cromosom absoarbe o cantitate de colorant proporţională cu mărimea sa. După marcare cu fluorocrom, cromsomii sunt trecuţi prin dreptul unei raze laser şi se măsoară intensitatea fluorescenţei. Cromosomii sunt apoi sortaţi automat, în funcţie de acest parametru, şi apoi izolaţi după mărime

1.6 . METODE DE CARTOGRAFIERE DE ÎNALTĂ REZOLUŢIE

Toate metodele prezentate anterior, bazate pe analiza citogenetică, permit localizarea unor gene sau secvenţe de ADN pe un cromosom, regiune cromosomică sau, cel mult, o bandă cromosomică ($1\text{-}5x10^6$ pb) (vezi tabel 3.3). Pentru *localizarea fină* a genelor au devenit accesibile - graţie tehnicilor de ADN recombinant - o serie de metode de înaltă rezoluţie. Ele acoperă "veritabila prăpastie" ce există între dimensiunile unei benzi cromosomice (1000-5000 Kb) şi cele ale taliei maxime a unui segment de ADN clonat (de circa 50 Kb) în care se includ genele de talie mijlocie (figura 3.30).

Evident, pentru un segment de ADN cromosomic de 1000 Kb există în băncile genomice mai multe secvenţe clonate de 20 - 50 Kb. Problema esenţială este de *a ordona aceste secvenţe,* de a le reuni fizic pentru a obţine un segment continuu de mai multe sute de Kb. Pentru aceste "acţiuni" s-au pus la punct noi tehnici de cartografiere de înaltă rezoluţie care au menirea să "acopere" intervalul metodologic între analiza (cito) genetică şi analiza moleculară şi să realizeze o cartografiere moleculară pe distanţe mari.

Fără a intra în detalii "procedura generală" este următoarea:
(1) se secţionează ADN dintr-o regiune cromosomică cu anumite enzime de restricţie pentru *a obţine fragmente* de o anumită dimensiune;
(2) aceste fragmente *se clonează* în vectori adecvaţi pentru mărimea lor (YACs pentru fragmente de 100-1000 Kb; BACs pentru 150-350 Kb; cosmide pentru 40 Kb; plasmide pentru 1-5 Kb) realizându-se biblioteci sau bănci de fragmente ce alcătuiesc împreună un anumit segment cromosomic (denumite după vectorul de clonare: biblioteci de YACs, BACs, cosmide, plasmide);
(3) fragmentele dintr-o colecţie se *analizează* pentru a identifica *repere* (de ex., STSs[34], SSRs[35]) şi apoi se compară unul cu altul pentru a găsi *secvenţe suprapuse* pe diferite fragmente;
(4) fragmentele (definite prin anumite repere) şi care au suprapuneri, deci sunt vecine (numite şi "*contigs"*), se *ordonează şi se orientează* pentru a forma o secvenţă continuă de ADN ce permite realizarea unei hărţi fizice. Această procedură se repetă pentru a obţine şi ordona fragmente din ce în ce mai mici.

> Operaţiunea începe cu fragmentarea unui segment de ADN în piese de circa 1000 Kb, care se încorporează în YACs şi se clonează; clonele YACs se analizează pentru a stabili poziţia şi ordinea STSs şi altor *repere caracteristice*; pe această bază se realizează ordonarea fragmentelor ce au secvenţe terminale identice (suprapuse) într-o secvenţă continuă ("*scaffold"*), realizând harta fizică a cromosomului /regiunii cromosomice respective. În felul acesta s-a realizat (Hudson et al, 1995) **harta fizică de joasă rezoluţie pentru** fiecare cromosom. Pentru realizarea **hărţii fizice de înaltă rezoluţie**, fragmentele de ADN clonate în YACs şi ordonate sunt tăiate fiecare cu alte enzime de restricţie în fragmente mai mici de 100-350 Kb şi clonate în BACs; cu aceste clone BACs se repetă operaţiile (3) şi (4); apoi se repetă fragmentarea (40 Kb), clonarea (în cosmide) şi ordonarea secvenţelor iar în final se face o nouă fragmentare (1-5 Kb), clonare (în plasmide) şi ordonarea secvenţelor

În final, fragmentele foarte mici (1-5 Kb) clonate în plasmide si apoi ordonate într-o secvenţă continuă sunt *secvenţiate individual* iar pe baza ordinii lor se stabileşte *secvenţa de nucleotide a cromosomului.* Toate operaţiunile au putut fi realizate în ultimii cinci ani, în cadrul Programului Genom Uman, datorită perfecţionării continue a tehnicilor, folosirii masive a automatizării şi informaticii, dar mai ales datorită unui efort internaţional remarcabil prin colaborarea oamenilor de stiinţă şi sprijinului politic şi financiar acordat acestui proiect gigant dar esenţial pentru omenire.

O problemă esenţială o reprezintă *identificarea genelor* în secvenţa de ADN a unui cromsosom. Ne vom referi concret la această problemă în subcapitolul umător dar aici vom menţiona numai tehnicile folosite, care sunt detaliate în literatura de specialitate (de exemplu, Strachan şi Read, 1999):

- **Zoo bloting (cross-species hybridization** – o clonă de ADN uman este hibridizată, în tehnica Southern blot, cu o varietate de secvenţe de ADN ale unor gene cu efecte deja cunoscute la *animale*;
- **Identificarea insulelor CpG** – multe gene au în regiunea promotor insule de CpG hipometilate, o structură caracteristică genei, ce pot fi identificate cu enzime de restricţie şi/sau PCR;
- **Exon trapping** – o secvenţă suspicionată a fi o parte din genă se introduce într-un plasmid şi acesta este supus transcripţiei într-o celulă gazdă; are loc procesarea ARNm cu eliminarea secvenţelor care nu sunt exoni;
- **Selecţia ADNc** – o secvenţă de ADN genomic va fi supusă hibridizării cu o populaţie dată de ADNc (obţinută pe baza ARNm din celulă, deci cprespunzătoare secvenţelor codante din ADN genomic);
- **Analiza computerizată a unei secvenţe de ADN** – foloseşte computerul pentru compararea unei secvenţe de ADN genomic şi o bază de date ce cuprinde **ESTs** (de la *Expressed Sequence*

[34] STSs de la "*sequence-targged sites"*, fragmente scurte (200-500 pb) de ADN care au o secvenţă unică cunoscută şi pot fi amplificate prin PCR.
[35] SSRs de la "*simple sequence repeat"* , secvenţe mici de 2-4 nucleotide repetate în tandem de sute de mii de ori

Tags) secvenţe de câteva sute de pb de la ambele capete ale unei clone de ADNc (ce este complementar ARNm din exoni, secvenţele codante ale genei);
- **Screeningul mutaţiilor în secvenţa omologată ca fiind o genă,** efectuat la bolnavi;
- **Testarea expresiei genei prin Northern blot.**

3. APLICAŢIILE CARTOGRAFIERII GENOMULUI UMAN

Aplicarea strategiior de cartografiere a genomului uman a reprezentat un progres remarcabil pentru cunoaşterea organizării şi funcţionării aparatului genetic şi un veritabil succes în practica medicală. *Harta genică reprezintă de fapt anatomia genomului uman.* Aşa cum anatomia este necesară pentru înţelegerea funcţiei corpului uman, cunoaşterea hărţii genice este indispenabilă pentru înţelegerea funcţiei genomului uman şi prin extensie, a noii fiziologii moleculare umane Localizarea unor gene mutante cu efect patologic sau "gene morbide" - în anumite regiuni cromosomice a demarat realizarea *"anatomiei patologice* a genomului uman". Pe această bază se dezvoltă cu mult succes următoarele acţiuni:
- elucidarea unor mecanisme patogenice în anumite boli monogenice sau multifactoriale;
- clonarea genelor pe baza localizării lor pe cromosomi ("clonare poziţională");
- dezvoltarea unor noi metologii de sfat genetic şi diagnostic genotipic cu ajutorul markerilor ADN;
- dezvoltarea strategiilor optime de terapie genică.

Importanţa teoretică şi practică a cartografierii genetice justifică eforturile actuale, ample şi costisitoare, pe care comunitatea ştiinţifică internaţională le face pentru "PROIECTUL GENOM UMAN". Fără a intra în detalii vom prezenta cu exemplificări, câteva din aplicaţiile menţionate, altele vor fi discutate în alte capitole.

3.1. LOCALIZAREA GENELOR MORBIDE

Dacă o genă suferă o mutaţie cu efect patologic (" genă-morbidă") se realizează un sistem alcătuit cel puţin din două alele: una normală şi alta morbidă (sau mai multe dacă se produc mutaţii diferite)[36]. Rezultă astfel un marker genetic fenotipic (gena este identificată prin efectele sale patologice).

Cartografierea genelor sau locilor morbizi se realizează prin analiza înlănţuirii lor cu markeri genotipici polimorfi în familiile în care se manifestă boala. Această analiză trebuie să ţină evident cont de modul de transmitere (autosomal dominant sau recesiv, legat de X) şi de penetranţă (vezi capitolul 4.A).

Cartografierea prin analiza înlănţuirii genetice necesită un *număr suficient de familii informative*, lucru deseori dificil deoarece multe boli genetice sunt individual rare si bolnavii pot deceda la o vârstă tânără, ne mai fiind disponibili pentru analiză. Identificarea unor *familii mari*, cu mai multe persoane afectate, în trei patru generaţii, este benefică în primul rând prin "materialul" disponibil pentru analiză şi în al doilea rând pentru că toţi bolnavii din familie au "aceeaşi boala genetică", produsă de o anumită mutaţia a unui singur locus (prin această metodă a familiilor mari – celulare - s-a reuşit localizarea genei pentru boala Huntington). În cazul în care această abordare familială nu este posibilă se vor "colecta" mai multe *familii mici* – nucleare - (lucru mai uşor pentru bolile mai frecvente de tipul mucoviscidozei) şi se va practica metoda scorului LOD aditiv. Există însă riscul ca nu toate familiile să aibă o boală genetică identică deci să fim confruntaţi cu fenomenul de heterogenitate genetică (mutaţii diferite, alelice sau nonalelice, produc acelaşi fenotip morbid). Pentru a obţine un LOD score > 3, care atestă înlănţuirea, este necesar ca markerul polimorfic să fie la o distanţă < 20 cM de locusul genei morbide cercetate. De acee, pentru a găsi un rezultat pozitiv de înlănţuire cu un locus autosomal se cercetează succesiv în medie 100 de markeri polimorfici pe o colecţie mai mare de familii afectate. Pentru bolile legate de X situaţia este mult mai uşoară, datorită densităţii genelor deja localizate şi modului particular de transmitere.

[36] Dacă avem certitudinea că boala este produsă de o singură genă mutantă ea se asimilează cu locusul ce trebuie cartografiat.

După ce se confirmă înlănţuirea cu locusul morbid, se vor testa şi alţi markeri ştiuţi că se plasează aproape de cel găsit înlăţuit, pentru a ne apropia cât mai mult de gena morbidă. În situaţia în care unul sau mai mulţi markeri sunt găsiţi la circa 5 cM de gena bolii ei pot fi folosiţi în scop diagnostic şi pentru izolarea genei morbide (clonare poziţonală).

În continuare vom prezenta două exemple de cartografiere genică devenite "modele" de lucru pentru toate acţiunile de localizare a genelor umane.

a. Localizarea genei pentru boala Huntington

Boala Huntington este o boală autosomală dominantă (1 la 20.000 indivizi) ce debutează după 37-40 de ani prin modificări de personalitate, pierderea treptată a memoriei şi o serie de tulburări motorii, inclusiv *coree* (mişcări involuntare ale membrelor) şi în final deces (vezi capitolul 11.D). Ele sunt produse de alterararea neuronilor din ganglionii bazali şi din cortex. Boala Huntington a fost prima boală genetică cartografiată printr-un screening sistematic al înlănţuirii unor markeri genotipici polimorfici (*"genome scan"*). Analiza de înlănţuire s-a efectuat (Gusela et al., 1983) pe o familie foarte mare din Venezuela. După testarea a 12 markeri polimorfici a fost identificat (cu o sondă numită G8) un polimorfism al enzimei de restricţie *Hind III* care produce pentru locusul D4S10, patru alele diferite asociate cu gena HD (de la *Huntington disease*), la un LOD score de 8.53 (la θ=0.0). Studiile ulterioare au stabilit că locusul detectat de markerul G8 este situat la 3-5 cM de gena Huntington şi au permis localizarea celor doi loci (G8 şi HD) pe cromosomul 4p16, foarte aproape de telomerul 4p într-o regiune de circa 1000 Kb. Atât G8 cât şi alţi markeri ADN pentru banda 4p16 pot fi folosiţi pentru **depistarea presimptomatică** a bolii Huntington în familiile cu risc. Clonarea ulterioară a genei HD a permis identificarea mutaţiilor cauzatoare de boală, stabilind că este vorba de *o expansiune* (amplificare >36 de copii) a unor repetiţii trinucleotidice, CAG, (vezi capitolul 11.D) care modifică o proteină (*huntingtina*) cu funcţie încă necunoscută. Acum expansiunea CAG din gena HD poate fi identificată direct prin PCR. Există o corelaţie strânsă între lungimea expansiunii CAG şi vârsta de debut a simptomelor dar testarea genetică presimptomatică ridică numeroase probleme etice (vezi capitolul 20).

b. Localizarea genelor pentru retinita pigmentară

Acest exemplu este caracteristic pentru cartografierea bolilor ce manifestă heterogenitate genetică şi utilizarea metodei "**genelor candidat**".

Retinita pigmentară (RP) (vezi caseta.....)reprezintă un grup de retinopatii relativ frecvent (1:4000 nn) în care se produce degenerarea retinei şi mai ales a fotoreceptorilor. Clinic se caracterizează prin reducerea progresivă a vederii periferice şi nocturne şi producerea orbirii. RP este un exemplu tipic de *heterogenitate genetică* (vezi capitolul 4.A.) deoarece manifestări fenotipice relativ identice sunt produse de gene distincte: 25% din cazurile familiale se transmit autosomal dominant, 45% autosomal recesiv şi 30% legat de X.

Studiile de înlănţuire genetică cu markeri de pe cromosomul X au identificat două gene care dau RP legate de X: una (20-40% din cazuri) este localizată în regiunea Xp11 iar cealaltă (60-80%) în regiunea Xq21.

RP autosomal dominantă prezintă şi ea două forme deosebite ca debut şi mod de afectare a fotoreceptorilor. Datorită posibilităţii existenţei unor loci autosomali multipli s-au studiat numai familiile mari[37]. Într-una din acestea s-a evidenţiat o înlănţuire strânsă cu un locus marker situat pe braţul lung al cromosomului 3. Identificarea genei responsabile foloseşte o strategie diferită de cea utilizată în boala Huntington şi mucoviscidoză: este vorba de cercetarea **genelor candidat**: se selectează *gene deja clonate* care sunt localizate în aceeaşi regiune cromosomică cu locusul marker din regiunea cromosomică respectivă sau gene despre care se ştie că au rol în fiziologia organului afectat. Apoi se analizează pe rând genele candidat la un grup de pacienţi căutând o eventuală mutaţie. Localizarea RP cu transmitere autosomal dominantă pe cromosomul 3q a dus imediat la

[37] Utilizarea unor studii combinate de înlănţuire realizate pe mai multe familii mici (ca şi în cazul mucoviscidozei) este inoperantă din cauza heterogenităţii genetice.

ipoteza că gena pentru *rodopsină* ce fusese deja localizată pe 3q, ar putea fi responsabilă de apariţia RP. Ipoteza s-a confirmat deoarece la 15% din pacienţii neînrudiţi s-a identificat o mutaţie punctiformă. În restul cazurilor este vorba fie de alte mutaţii neidentificate ale acestei gene, fie mai probabil mutaţii ale unor gene cu altă localizare.

CASETA 3.6

OMIM 180100; 600132; 312600

Retinita pigmentară

Definiţie: grup de afecţiuni ereditare în care anomaliile fotoreceptorilor (conuri şi bastonaşe) sau ale epiteliului pigmentar retinian duc la pierderea progresivă a vederii.

Incidenţă: 1/3.500-1/4.000 în Europa şi SUA, fără specificitate etnică.

Manifestări clinice. Iniţial adaptare defectuoasă la întuneric (cecitate nocturnă). Ulterior limitare progresivă a câmpului vizual periferic (vedere în tunel), cu păstrarea acuităţii vizuale centrale. Fund de ochi: arteriole îngustate, pigmentări intraretiniene (iniţial fine, ulterior grosiere), pierderea pigmentului din epiteliul pigmentar. Uneori: cataractă subcapsulară (posterior), particule fine în vitros, puncte albe în retină, corpi hialini ai capului nervului optic.

Au fost identificate următoarele categorii de retinită pigmentară:

- *nonsindromică* (fără alte localizări); poate fi familială (multiplex), afectând mai mulţi membri ai familiei, sau izolată (simplex), afectând un singur individ.
- *sindromică* (afectează şi alte sisteme, cum ar fi auzul):
- *sistemică* (afectează multiple ţesuturi).

Patogenie: încă neelucidată complet. Mutaţiile afectează diferite proteine: rodopsina, proteine ale fototransducţiei în bastonaşe (subunitatea α a canalului proteic cationic cGMP şi subunităţile α şi β a fosfodiesterazei cGMP), proteine pentru menţinerea structurii discurilor segmentului extern al fotoreceptorilor, periferină şi proteina 1 membranară a segmentului extern al bastonaşelor.

Genetică: RP se transmite AD (15-25%), AR (5-20%), RX (5-15%), digenic sau mitocondrial; 40-50% din cazuri apar izolat.

RP se caracterizează prin *heterogenitate genetică* (mai multe gene diferite pot determina aceeaşi boală), *heterogenitate alelică* (mutaţii diferite în aceeaşi genă pot determina aceeaşi boală sau boli diferite) şi *heterogenitate clinică* (indivizi diferiţi cu aceeaşi mutaţie pot avea simptome diferite). S-au identificat mai mult de 20 de loci ce pot produce RP

Diagnostic: Diagnosticul de RP se stabileşte pe următoarele elemente: Disfuncţie a conurilor: adaptare dificilă la întuneric (prag final crescut al conurilor) sau electroretinogramă (răspunsul conurilor cu amplitudine redusă şi timp implicit prelungit sau nedetectabil); Pierdere progresivă a funcţiei fotoreceptorilor; Pierderea vederii periferice; Afectare bilaterală. Sunt indicate: anamneză familială pe cel puţin 3 generaţii şi examinare clinică şi oftalmologică (pentru formele sindromice).

Diagnostic diferenţial: sindromul Usher, atrofia girată a coroidei şi retinei, coroidemia, distrofia conuri- bastonaşe (RP centrală/ inversă), amauroza congenitală Leber, RP unilaterală.

Diagnostic prenatal: deocamdată indisponibil.

Screening neonatal: deocamdată indisponibil.

Sfat genetic: se identifică tipul de transmitere şi se calculează riscul de recurenţă.

Prognostic: în forma nonsindromică prognosticul este bun; în formele sindromice sau sistemice prognosticul poate fi umbrit de afectarea altor organe.

Tratament: degenerarea retiniană se tratează cu vitamina A; cataracta se tratează chirurgical; ochelari speciali.

3.2 CLONAREA GENELOR MORBIDE PE BAZA CARTOGRAFIERII GENETICE: "CLONAREA POZIŢIONALĂ" SAU " GENETICA INVERSĂ"

Pentru izolarea şi clonarea unei gene ce produce o boala există două posibilităţi (figura 3.31). Prima pleacă de la identificarea prealabilă a defectului funcţional şi caracterizarea funcţiei (deci a produsului) genei – proteina anormală; pe baza secvenţei de aminoacizi se construiesc oligosonde cu care se cercetează localizarea genei; această metodă "a geneticii clasice" numită **clonare funcţională** (deoarece pleacă *de la funcţie la genă*) a permis identificarea mai multor gene, ce produc diferite boli: hemoglobinopatii, hemofilia, etc. A doua posibilitate se bazează pe analiza cartografiei genetice. Cu ajutorul unor markeri genetici (ADN) polimorfici se izolează şi clonează secvenţa de ADN genomic implicată într-o boală ereditară sau într-o anumită funcţie sau fenotip în general. Apoi se stabileşte secvenţa nucleotidică codantă pe baza căreia se deduce proteina codificată. Această metodă, care porneşte *de la genă şi ajunge la funcţie* şi la proteină se numeşte "*genetică inversă*" sau "**clonare poziţională**". Ea a fost aplicată cu succes la bolile genetice "cu genă necunoscută" (de ex. miopatia Duchenne, mucoviscidoza). Are avantajul că oferă posibilitatea unui *diagnostic genotipic precoce*, chiar şi atunci când nu au fost complet rezolvate toate etapele.

Strategia *geneticii inverse* se realizează în mai multe etape (figurile 3.32):

(1) Identificarea unei înlănţuiri genetice între locusul morbid şi un marker genotipic, prin analiza segregării lor în familiile afectate (valori $\theta<0.5$ şi LOD score > 3). Dacă nu există "un fir conducător", un element orientativ (de ex. o translocaţie / microdelecţie asociată cu gena cercetată), se explorează metodic (*"genom scan"*) fiecare cromosom cu ajutorul markerilor genotipici spaţiaţi la intervale regulate. Această etapă este destul de lungă şi dificilă.

(2) Localizarea cromosomică regională şi *restrângerea* locusului posibil al genei într-un teritoriu delimitat se face apropiindu-ne cât mai mult de genă, la 1-2 cM. Este utilă găsirea a doi markeri genotipici polimorfi care să încadreze gena, într-un număr mare de familii afectate.

(3) Identificarea genei în domeniul delimitat de markeri face apel la numeroase indicii şi metode; Cu ajutorul vectorilor YACs (500-1000 Kb) şi BACs (50-200 Kb) se realizează clonarea unui număr mare de segmente de ADN din *regiunea* candidat. Uneori este rapid identificată o *"genă candidat"* din regiune, pe baza funcţiei şi localizării ei în regiunea unde a fost localizată gena boală. Indicatorul ferm al "găsirii" genei este prezenţa unui exon transcris în ARN mesager matur provenind din ţesuturile afectate de boală precum şi a mutaţiilor specifice acestei gene la bolnavi.

(4) După descoperirea şi clonarea genei se reconstituie (pe baza secvenţei codante) secvenţa de aminoacizi a proteinei şi apoi se fabrică un peptid sintetic; cu ajutorul acestui peptid sintetic se fabrică *anticorpi* care să permită identificarea proteinei echivalente în organism. După izolare, proteina este analizată structural şi funcţional încercând obţinerea pe această cale a unor informaţii fiziopatologice despre boală. Cu ajutorul anticorpilor se încearcă elaborarea unor teste de diagnostic fenotipic, mai simple şi mai puţin laborioase decât diagnosticul genotipic.

(5) Se cercetează concomitent gena izolată pentru a-i descifra "anatomia", mecanismele (secvenţele de reglare) precum şi pentru a determina leziunile prezente în genele mutante ale bolnavilor, corelaţia lor cu tabloul clinic etc.

Vom prezenta spre exemplificare două succese remarcabile ale "geneticii inverse": izolarea şi clonarea genelor distrofiei musculare Duchenne şi mucoviscidozei (sau fibrozei chistice). Ele au fost laborioase dar metodolgia folosită este utilă pentru a identifica genele implicate în numeroase alte boli genetice umane.

a. Distrofia musculară Duchenne

Distrofia musculară (miopatia) Duchenne (DMD) este o boală recesivă legată de X, (vezi capitolul 11.D.2) care afectează băieţii, la vârsta de 3-4 ani. Ea se caracterizează prin apariţia precoce a unei slăbiciuni musculare; deficitul motor creşte progresiv şi băieţii afectaţi sunt de obicei invalizi la 10 ani şi decedează prin insuficienţă respiratorie către 20 de ani. O formă mai puţin

severă de miopatie, cu debut mai tardiv şi durată de viaţă mai lungă este distrofia musculară Becker (DMB), cosiderată o formă alelică a DMD.

Clonarea poziţională a genei DMD s-a făcut prin două abordări diferite. Prima (Ray et al, 1985), a studiat cazurile rare de femei bolnave, cu tranlocaţia X/autosom. Autosomul implicat diferă în fiecare caz dar situsul translocaţiei pe X este totdeauna acelaşi: Xp21. Într-unul din cazuri, cu t(X;21), segmentul de X este translocat pe braţul scurt 21, în regiunea unde sunt localizate genele ribosomale. Prin clonarea ADN din X ataşat la genele ribosomale s-a obţinut o secvenţă din X care face parte din gena DMD. A doua abordare (Kunkel et al, 1985) s-a bazat pe deleţia ADN ce corespunde regiunii Xp21.2. Într-un caz particular, un băiat care prezenta DMD şi alte trei caractere legate de X (boală granulomatoasă cronică, retinită pigmentară şi un grup sanguin rar). Printr-o tehnică ingenioasă cercetătorii au obţinut clone genomice care existau pe cromosomul X normal dar erau absente în ADN-ul acestui bolnav. Una din aceste clone (pERT87) conţine segmentul de ADN ce lipseşte în cazul deleţiei Xp21. Folosind această clonă ca sondă şi hibridizând-o cu ADN de la alţi bolnavi cu DMD (fără deleţie cromosomică vizibilă) s-a observat că pERT87 era absentă, total sau parţial, la mulţi bolnavi. Deci cel puţin un segment al genei DMD se găseşte în pERT87; unele deleţii care implicau regiunea pERT87 se extindeau dincolo de "marginile" ei, indicând că gena DMD este foarte mare.

Apoi cercetătorii folosind sondele sintetice de ADN (corepunzătoare unei părţi din gena DMD) au depistat (prin Northern blot) în celulele musculare un ARNm de 14 Kb El a fost folosit pentru obţinerea şi clonarea ADNc care corespunde genei DMD, o genă gigantă de 2300 Kb (1,5% din cromosomul X), cu 79 de exoni.

Plecând de la ADNc pentru DMD s-a dedus, pe baza codului genetic, secvenţa de aminoacizi a proteinei codificate, numită **distrofină**; ea este absentă la bolnavii cu DMD. La persoanele sănătoase s-a stabilit că distrofina se localizează în membrana celulelor musculare şi este implicată în contracţia muşchilor striaţi şi cordului.

În majoritatea cazurilor de DMD se produc deleţii totale sau parţiale ale genei. În distrofia musculară Becker leziunile ADN sunt localizate tot în gena DMD (de pe X p21) dar sunt mai reduse, astfel că celulele musculare conţin mici cantităţi de distrofină sau o proteină asemănătoare cu talie anormală.

b. Mucoviscidoza

Mucoviscidoza sau fibroza chistică este una din cele mai frecvente boli autosomal recesive în populaţiile caucaziene (1-2500 nn) (vezi capitolul 11.D.2). Boala se caracterizează clinic prin secreţii reduse şi vâscoase ale pancreasului exocrin (de unde denumirea iniţială a bolii *cystic fibrosis of the pancreas*), care produc insuficienţă pancreatică şi malnutriţie cronică; uneori se produce un ileus meconial (cu obstrucţie intestinală) la nou născut. Glandele sudoripare sunt de asemeni afectate, producându-se un nivel crescut al clorului în sudoare (*"testul transpiraţiei*). Bărbaţii pot avea absenţa sau obstrucţia canalelor deferente, fiind sterili. Problema cea mai gravă o reprezintă obstrucţia cronică a bronşiolelor prin mucus vâscos şi infecţiile pulmonare recidivante, care în 90% de cazuri produc decesul bolnavului (la circa 30 de ani).

Datorită frecvenţei şi gravităţii sale mucoviscidoza a constituit un obiectiv important al strategiilor de clonare poziţională. După câţiva ani de cercetări, a fost stabilită în 1985 o înlănţuire a genei CF (prescurtare de la "*cystis fibrosis*") cu markeri situaţi pe cromosomul 7 (Tsui et al, 1985. Foarte repede au fost testaţi şi alţi markeri ADN ai cromosomului 7 şi gena CF a fost localizată în regiunea 7q31-32, între markerii *met* (o oncogenă) şi *D7S8* (o secvenţă anonimă). Distanţa dintre aceşti markeri era de circa 1.6 milioane Kb (circa 2cM), o regiune suficient de mare pentru a conţine circa 50 de gene. Prin analiza unui număr mare de familii cu CF s-a redus treptat aria de localizare a genei. Cu ajutorul unor markeri situaţi foarte aproape de locusul CF s-a evidenţiat o asociere preferenţială (un dezechilibru de înlănţuire) a genei CF cu doi markeri învecinaţi (XV-2c şi KM-19) la 90% din familiile neînrudite care aveau un bolnav de CF. Într-o regiune de 500 Kb în apropierea acestor markeri au fost identificate, în 1989, patru gene; una din aceste gene avea o

secvenţă conservată în evoluţie (prezentă deci şi la alte specii), care a devenit gena-candidat pentru CF. Transcriptul (ARNm) al acestei gene a fost găsit în toate ţesuturile afectate de CF (pancreas, plămâni, ficat, gande sudoripare). Acest ARNm matur (cu o lungime de 6129 pb corespunde unei gene (clonată prin tehnica ADNc) de circa 250 Kb, cu 27 exoni. El codifică o proteină de 1480 aminoacizi, fixată în membrana celulară şi consumatoare de ATP, care funcţionează ca o pompă moleculară, formând un canal pentru ionii clor; ea a fost numită proteina CFTR (de la "CF transmembrane conductance regulator")

Valoarea acestei gene-candidat necesita identificarea mutaţiilor prezente numai la bolnavii cu CF. Prin secvenţierea ADNc extras de la diferite persoane s-a identificat o deleţie de 3 pb care duce la dispariţia unui aminoacid (fenilalanina) în poziţia 508. Această mutaţie (numită Δ F508) se întâlneşte la peste 70% din bolnavii cu CF.

Clonarea genei CF are multiple consecinţe practice: diagnosticul prenatal în familiile cu risc; depistarea heterozigoţior pentru CF (5% din populaţie); elucidarea unor mecanisme patogene ale bolii; optimizarea posibilităţilor terapeutice şi abordarea terapiei genice.

Strategia clonării poziţionale (a geneticii inverse), verificată perfect în cazul CF, DMD, NF1 etc a adus o enormă deschidere pentru abordarea altor boli produse de gene necunoscute.

3.3 . ANATOMIA PATOLOGICĂ (MORBIDĂ) A GENOMULUI UMAN

Strategiile de cartografiere fizică şi genetică prezentate şi exemplificate în acest capitol au permis identificarea şi localizarea în genomul uman a peste 10.000 loci definiţi printr-o genă identificată, un marker genetic sau o sondă anonimă. Dintre acestea 2372 sunt gene exprimate (din care 1502 sunt loci morbizi); restul sunt segmente anonime. În tabelul 3.5 prezentăm cele mai cunoscute boli monogenice localizate până în prezent, la care s-a identificat şi proteina mutantă; pentru multe din ele este deja posibil un diagnostic prenatal sau presimptomatic. În figura 3.36 se poate observa harta genică a cromosomilor 7 şi X cu localizările regionale ale genelor implicate în boli genetice.

Tabel 3.5 Exemple de boli monogenice localizate pe cromosomi prin analiza de înlănţuire

BOALA	MOD DE TRANSMITERE	LOCALIZARE
Ataxia FRIEDREICH	AR	9q13-21.1
Ataxia spinocerebeloasă 1	AR	6p
Ataxia telangiectazia	AR	11q22-23
Boala Alzheimer 1	AR	21q21-22.1
Boala HUNTINGTON	AD	4q16.3
Distrofia miotonică	AD	19q
Distrofia musculară DUCHENNE	LX	Xp21
Fibroza chistică (MV)	AR	7q31-32
Hipercolesterolemia cu xantomentoză	AD	6p21.3
Neoplazia endrocrină multiplă (1)	AD	11q
Neoplazia endrocrină multiplă (2A)	AD	10cen
Neoplazia endrocrină multiplă (2B)	AD	1q
Neurofibromatoza tip 1	AD	17q11.2

Neurofibromatoza tip 2	AD	22q
Polichistoza renală tip adult	AD	16p13
Polipoza familială de colon	AD	5q21-22
Retinita pigmentară	LX	Xp11, Xp21
Retinita pigmentară (unele familii)	AD	3q21-24
Retinoblostomul	AD	13q14
Sindromul ALPORT	LX	Xq22
Sindromul MARFAN	AD	15q
Sindromul X fragil	LX	Xq27

3.4. DIAGNOSTICUL GENELOR MUTANTE PRIN ANALIZA ÎNLĂNŢUIRII GENETICE

Ideea folosirii înlănţuirii genetice dintre o genă mutantă şi o genă-marker polimorfică pentru diagnosticul unor boli genetice datează de câteva decenii. Cu toată importanţa practică a acestui concept, demonstrată efectiv în câteva cazuri (înlănţuirea distrofie miotonică - secretor sau deficienţă în 21-hidroxilază şi locusul HLA B), valoarea diagnostică a înlănţuirilor genetice a fost larg acceptată abia după 1980 când folosirea markerilor polimorfici ADN s-a dovedit accesibilă şi valoroasă mai ales în situaţia în care gena morbidă a fost localizată dar nu a fost clonată şi deci nu se cunosc informaţii despre natura moleculară sau biochimică a bolii. Acest lucru este util în special în cazul mutaţiilor fără expresie fenotipică (debut tardiv al bolii, lipsă de penetranţă) deci într-un *stadiu presimptomatic* (exemplul tipic îl reprezintă boala Huntington), precum şi în *diagnosticul prenatal.*

Fără a intra în detalii (vezi capitolul 9.B.2) vom preciza că folosirea markerilor strâns înlănţuiţi cu o genă mutantă este o metodă de *diagnostic genotipic indirect* care reclamă o serie de condiţii: să existe o înlănţuire strânsă între mutaţie şi marker astfel că o recombinare prin CO să fie improbabilă; familia să fie informativă deci să fie disponibili pentru analiză atât bolnavul cât şi ascendenţii săi iar toţi să fie heterozigoţi pentru ambii loci: boală şi marker; să se cunoască faza de înlănţuire a genelor-boală şi marker sau să poată fi presupusă cu mare probabilitate. Vom preciza de asemenea că există pericolul unui diagnostic eronat dacă: (1) se produce un CO meiotic între cei doi loci care nu sunt strâns înlănţuiţi (de ex. în cazul unui marker ce prezintă 5% recombinări cu locusul morbid riscul de eroare al diagnosticului este 5%; în acest caz acurateţea diagnosticului poate fi sporită dacă se folosesc doi markeri genetici ce flanchează gena mutantă); (2) nu se alege corect markerul în bolile cu heterogenitate genetică.

Diagnosticul bazat pe înlănţuire genetică implică studiul extensiv al mai multor membri ai familiei fapt ce creşte dificultatea şi costul analizelor dar mai ales ridică probleme particulare de etică medicală (consimţământul, confidenţialitatea, accesul limitat la informaţii a membrilor familiei, implicaţiile deciziei şi rezultatelor, informaţii neaşteptate de tipul nonpaternităţii etc).

4. PROIECTUL GENOM UMAN

Rezultatele obţinute prin cartografierea genetică şi fizică a unor gene morbide au generat un consens al comunităţii ştiinţifice asupra necesităţii descifrării întregului genom uman, decisivă pentru înţelegerea geneticii umane, cu un beneficiu potenţial considerabil pentru sănătatea umană. "Proiectul genom uman" a fost lansat în 1990 şi reprezintă un model de cooperare interdisciplinară şi internaţională pentru a cartografia şi secvenţia tot ADN uman până în 2005. Coordonarea

activităţilor pe care le fac diferite grupuri de cercetători din peste 20 de ţări este asigurată de *The Human Genome Organization (HUGO)*

Proiectul are trei obiective majore: (1) o hartă a markerilor genetici; (2) o hartă fizică; (3) secvenţierea completă a genomului uman (3 giga baze). S-au făcut progrese importante în realizarea acestor obiective în primul rând datorită dezvoltării unor tehnologii performante, bazate pe automatizare şi computere.

Harta genetică. Aşa cum am precizat anterior, prin analiza de înlănţuire şi clonare poziţională se pot identifica genele implicate în producerea multor boli umane, chiar fără să cunoaştem de la început funcţia acestor gene. Metodele dezvoltate necesită însă existenţa unei hărţi genetice precise şi deaceea a fost firesc ca elaborarea unei astfel de hărţi, cu markeri informativi spaţiaţi la 2-5 cM, să reprezinte prioritatea Proiectului. Tehnologia de producţie a markerilor genetici s-a perfecţionat şi în 1994 mai mult de 5000 de astfel de markeri (în special minisateliţi) au fost plasaţi pe prima schiţă de hartă genetică (de „joasă rezoluţie"). Harta a fost apoi completată şi include în prezent peste 20.000 de markeri polimorfici, distribuiţi în întreg genomul, la intervale mai mici de 1 cM. Cu această gamă largă de markeri strâns înlănţuiţi poate fi găsită orice genă. Recent a început identificarea şi cartografierea a circa 100.000 de SNPs (de la *single nucleotid polymorhism*), variante ale unui singur nucleotid uşor de procesat prin noile tehnologii automate (DNA chips).

Harta fizică. A doua etapă a proiectului constă în realizarea unei *hărţi de restricţie* prin determinarea situsurilor de restricţie din jurul markerilor genetici, care să permită *obţinerea unor fragmente de ordinul 10^6 pb* (deci 1cM), prin secţionare cu enzime de restricţie care taie "rar" genomul uman (producând fragmente mari) ce vor fi separate prin electroforeză în câmp pulsatil. Fragmentele vor fi clonate în cromosomi artificiali (YACs, BACs, PACs, cosmide) şi apoi ordonate cu ajutorul STSs, indicatori fizici valoroşi (un fel de "amprente genetice") pentru a pune clonele în ordinea în care se găsesc în genom, cu ajutorul computerelor. S-a realizat (1998) o hartă de distribuţie a pecte 44.000 de STSs, distribuiţe la intervale de circa 100 Kb.

Secvenţierea completă a genomului uman. Ultima etapă şi cea mai laborioasă este determinarea *secvenţei* nucleotidice reale a setului de clone suprapuse, ordonat după poziţia naturală în genom. Ea va putea fi realizată numai cu ajutorul maşinilor automate de secvenţiat. Dar aceasta nu înseamnă că genele structurale sunt uşor de identificat printre numeroasele secvenţe necodante ce alcătuiesc 95% din ADN uman. Au fost elaborate alte tehnologii sofisticate pentru realizarea acestei sarcini de o mare dificultate. Aşa cum am mai spus în februarie 2001 a fost publicată schiţa secvenţei genomului uman.

Consecinţele cartografierii genomului uman pentru biologia şi genetica umană vor fi probabil enorme deoarece vor permite elucidarea structurii şi funcţiei genomului uman în stare normală şi patologică. Cercetările nu se vor încheia în 2005 deoarece înţelegerea complicatelor mecanisme ale reglării expresiei genice, interacţiunile dintre gene (genomics) sau dintre proteinele (proteomics) ce alcătuiesc organismul uman - vor reprezenta noi obiective, considerabile prin dficultăţi şi, evident, prin implicaţii. La aceasta se va adăuga dezvoltarea terapiei genice şi identificarea genelor ce contribuie, alături de mediu, la producerea bolilor comune ca hipertensiunea arterială, boala coronariană, diabetul zaharat, psihoze, etc. Această acţiune a fost deja demarată şi va duce cucertitudine la cunoaşterea mai exactă a mecanismelor de producere a bolilor, creşterea eficienţei tratamentului şi mai ales a profilaxiei lor (pe baza identificării riscului individual), printr-o veritabilă medicină predictivă.

INTERNET

1. Dicţionar de biologie celulară: http://www.mlab.gla.ac.uk/~julian/Dict.html
2. Genetică medicală - University of Utah School of Medicine: http://medgen.genetics.utah.edu
3. Principii de genetică -Indiana U niversity Biotechnology: http://biotech.chem.indiana.edu
4. National Human Genome Research Institut: http://www.nhgri. nih.gov.

5. National Center for Biotechnology Information: : http://www.ncbi.nlm. nih.gov.
6. Whitehead Genome Institute at the Massachusetts Institute of Technology: http://www-genome.wi.mit.edu
7. Sanger Center in Cambridge, England: http://www.sanger.ac.uk/
8. Genethon, French Genetic Mapping Program: http://www.genethon. fr

Bibliografie specifică selectivă

1. Ardlie K.G., Kruglyak L., Sielstad M. *Patterns of linkage disequilibrium in the human genome.* Nat Rev Genet. 2002;3:299-309.
2. Collins FS. *Sequencing the human genome.* Hosp.Practice. 1997; 32:35-54
3. Hurst G.D., Werren J.H. *The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution.* Nat Rev Genet. 2001;2:597-606.
4. Huxley C. *Mammalian artificial chromosomes and chromosome transgenics* . TIG, 1997;13:345-348
5. Jorde LB. *Linkage disequilibrium as a gene mapping tool.* Am.J.Hum.Genet. 1995;56:11-14
6. Kazazian H.H., Moran J.V. *The impact of L1 retrotransposons on the human genome*. Nature gen. 1998;19:19-23
7. Majevski J., Ott J. *Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome*. Genome Res. 2002;12:1827-36.
8. Petes T.D. *Meiotic recombination hot spots and cold spots.* Nat Rev Genet. 2001; 2:360-9
9. Pingoud A., Jeltsch A. *Structure and function of type II restriction endonucleases.* Nucleic Acids Res. 2001;29:3705-27.
10. Pollack J.R., Iyer V.R. *Characterizing the physical genome*. Nat Genet. 2002;32 Suppl:515-21.
11. Rosenthal N. - *Fine structure of a gene - DNA sequencing* - N. Engl.J.Med 1995, 332, 589-591
12. Scwartz RS - *Jumping genes* - N. Engl.J.Med 1995, 332, 941-944
13. The International Human Sequencing Consortium. *The human genome: Sequencing and initial anlysis.* Nature 2001; 409:860-921
14. WHO: *Genomics and World Health. Report of the Advisory Commitee on Health Research.* WHO. Geneva. 2002

CAPITOLUL 4

EXPRESIA INFORMAŢIEI EREDITARE (FUNCŢIA GENEI)

Mendel (1865) a fost primul care a intuit existenţa unor "*factori ereditari*" (numiţi mai târziu gene) ce determină formarea caracterelor fenotipice ereditare. Aforismul *"o genă → un caracter"* a dominat genetica clasică până când s-a stabilit că genele sunt alcătuite din ADN iar substratul molecular al oricărui caracter este o proteină structurală sau o enzimă. Conceptul clasic "o genă → un caracter" a devenit *"o genă (ADN) → o proteină"*, postulând că informaţia ereditară conţinută în ADN se exprimă prin sinteza unor proteine specifice, care stau la baza caracterelor. Acest proces, care reprezintă în fond **funcţia genei**, este *precis coordonat şi reglat* în raport cu programul dezvoltării ontogenetice a organismului sau de către necesităţile sale în anumite condiţii metabolice, impuse de mediu.

A. CONCEPŢIA CLASICĂ DESPRE FUNCŢIA GENEI

1. GENA UNITATE DE FUNCŢIE ŞI MUTAŢIE.

Relaţia *"o genă → un caracter"* este axioma fundamentală a geneticii clasice. Această "dogmă" poate fi demonstrată prin studiul mutaţiilor: *modificarea genei va produce o modificare ereditară a caracterului determinat de genă*. Exemplele sunt numeroase şi cunoscute. Să reamintim că pe cromosomul X există o genă care determină prezenţa pigmentului melanic în iris şi retină; mutaţia ei are drept consecinţă absenţa melaninei şi *albinismul ocular*.

Oricât ar părea de paradoxal la prima vedere, mutaţia "developează" existenţa unei gene normale şi dă informaţii privind modul ei de acţiune şi de transmitere. Geneticianul depinde de apariţia mutaţiilor pentru "a învăţa" cum se produce şi se transmite un caracter normal. De aceea, deseori denumirea unei gene normale s-a făcut printr-o abreviere de 2-3 litere a efectului genei mutante (denumit în limba engleză) iar numele locusului, după prima mutaţie detectată[1]. De ex:

- CF de la *"cystic fibrosis"* (sau mucoviscidoză);
- FH de la *"familial hypercolesterolemia"*;
- PKU de la *"phenylketonuria"*;
- NF1 de la *"neurfibromatosis"* tip I;
- DMD de la *"Duchenne muscular dystrophy"*;
- PKD de la *"polycystic kidney disease"*, ş.a

Gena normală evidenţiată prin mutaţie (denumită uneori "genă de tip sălbatic", pentru a sublinia forma "standard" sub care se găseşte deobicei în natură), se notează cu semnul + după denumirea efectului fenotipic al mutaţiei; în funcţie de modul de transmitere genele dominante se scriu cu majuscule, iar cele recesive cu litere mici. În prezent, acţiunile de "descifrare" a genomului uman au impus utilizarea unei terminologii şi nomenclaturi unice (internaţionale) a

[1] De ex., la Drosophila, locusul pentru gena normală (de tip sălbatic) ce dă obişnuit culoarea roşie a ochilor a fost numit *"white"* (prescurtat *w+*) deoarece prima mutantă descrisă produca ochi de culoare albă.

genelor (care se regăseşte în "GENATLAS", accesibil “în linie” la adresa http://www.infobiogen.fr).

Se poate concluziona că în toate studiile de genetică clasică se pleca de la caracter la genă iar *gena era considerată unitatea de functie şi de mutaţie*. Relaţia "o genă → un caracter", care reflectă în esenţă relaţia "genotip → fenotip", (vezi capitolul 1.B.3), este însă mult mai complexă, deoarece:

- alături de caracterele "monofactoriale" sau monogenice, produse de o singură pereche de gene alele, există numeroase *caractere poligenice sau "multifactoriale*", determinate prin acţiunea mai multor gene nealele şi influenţate de factori de mediu; de obicei caracterele monogenice sunt caractere calitative, iar cele poligenice / multifactoriale sunt cantitative;
- în unele cazuri o genă poate avea *efecte multiple* şi poate determina mai multe caractere; acest fenomen se numeşte pleiotropie; în alte cazuri două sau mai multe gene participă la realizarea unui caracter;
- există numeroase *interacţiuni alelice, nonalelice şi cu mediul* - care influenţează efectul genei, momentul sau tipul celular în care se exprimă o genă;
- mutaţii ale unor gene diferite se pot manifesta fenotipic identic sau asemănător; acest fenomen se numeşte *heterogenitate genetică*.

2. POLIGENIA

Anumite caractere fenotipice complexe, normale sau anormale) sunt produse prin acţiunea mai multor gene nealele (situate în loci diferiţi) care *au efecte cantitative, mici şi aditive* (cumulative). Acest fenomen se numeşte **poligenie.** În acest caz "abaterea" de la regula "o genă → un caracter" este aparentă, deoarece fiecare genă determină “o parte” din caracter. Numărul de gene care participă la realizarea caracterului este necunoscut; el variază la persoane diferite şi de aceea *distribuţia caracterului respectiv în populaţie va corespunde unei curbe normale, de tip Gaussian* (*distribuţie continuă*). În figura 4.1 sunt prezentate două caractere normale - talia şi tensiunea arterială sistolică – care prezintă, într-o populaţie neselecţionată, o distribuţie continuă.

Trebuie să subliniem două caracteristici esenţiale ale poligeniei:

- genele care produc caracterul *acţionează independent* unele de altele; între ele nu există relaţii de dominanţă-recesivitate sau epistazie;
- expresia fenotipică a genelor poate fi frecvent *influenţată de factori de mediu*; de aceea caracterele produse prin acţiunea combinată a mai multor factori genetici şi factori negenetici se numesc curent **caractere multifactoriale**. Acest termen este mai larg şi nu trebuie echivalat cu cel de poligenie; acesta are un sens mai restrictiv şi nu implică o componentă de mediu.

Caracterele multifactoriale normale (talia, tensiunea arterială, culoarea pielii, inteligenţa ş.a.) sau anormale (numeroase boli comune, malformaţii congenitale izolate / unice, unele forme de cancere etc.) sunt frecvente şi ele vor fi discutate pe larg într-un capitol distinct. Vom sublinia totuşi aici că în aceste caractere multifactoriale componenta genetică este deseori reprezentată totuşi de un număr mic de gene, ce prezintă mai multe variante alelice în populaţie (unele dintre ele având efecte calitative, majore); în acest caz se vorbeşte de **oligogenie**.

3. PLEIOTROPIA

Prin **pleiotropie** (sau polifenie) defineşte fenomenul în care o singură genă (dominantă) sau o pereche de gene (recesive) produc efecte fenotipice diverse în mai multe sisteme de organe şi funcţii. În genetica clinică se întâlnesc numeroase cazuri de pleiotropie, ce reprezintă diferite

sindroame[2]. Un frumos exemplu îl reprezintă **sindromul Marfan** (vezi şi caseta 4.1). Acesta se caracterizează prin trei categorii de semne:

- modificări scheletice: membre lungi, degete lungi şi fine (arahnodactilie), hiperlaxitate articulară (ce produce frecvent luxaţii), deformaţii ale coloanei vertebrale (cifoză, scolioză) sau ale sternului (pectus carinatus sau excavatum) etc;
- modificări oculare: subluxaţie/ectopie de cristalin, miopie sau hipermetropie forte, megalocornee etc.;
- modificări cardiovasculare: anevrisme (dilataţii) ale aortei, prolaps de valvă mitrală etc.

CASETA 4.1 *OMIM 154700*

Sindromul Marfan

Definiţie: *Afecţiune a ţesutului conjunctiv transmisă autosomal dominant, cu expre-sivitate variabilă, şi manifestată sub formă de anomalii oculare, articulare şi cardio- vasculare.*

Incidenţă: *1/10.000, fără predilecţie geografică sau etnică.*

Manifestări clinice: *Boala se manifestă cu anomalii în trei sisteme major: scheletic, ocular, cardio-vascular; mai rar se întâlnesc afectări cutanate, pulmonare şi durale. Anomaliile scheletice includ: talie înaltă disproporţionată (pe seama membrelor), arahnodactilie, deformări ale sternului, scolioză, laxitate şi hipermobilitate articulară. Anomaliile oculare sunt reprezentate de miopie, subluxaţie de cristalin, cornee plată, hipoplazie iriană. Malformaţiile cardio-vasculare includ: prolaps de valvă mitrală, insuficienţă aortică, dilataţia şi ruptura aortei ascendente.*

Multe semne ale sindromului Marfan se dezvoltă cu vârsta

Patogenie: *în sindromul Marfan se produce – prin mutaţia genei FBN1 - o alterare a structurii ţesutului conjunctiv, care explică manifestările sale clinice. Gena FBN1 codifică fibrilina 1, o glicoproteină extracelulară ce formează microfibrile în structura ţesutului conjunctiv. Mutaţiile FBN1 sunt foarte variate şi produc boala printr-un fenomen de dominanţă negativă (la heterozigoţii An, fibrilina modificată produsă de gena A, inhibă formarea de microfibrile deşi gena n codifică o fibrilină normală). Circa 20 % din cazuri sunt produse de mutaţii noi. Interesant de subliniat că unele mutaţii produc sindroame înrudite cu sindromul Marfan: arahnodactilia familială, fenotipul MASS (de la mitral, aorta, skeletal, skin), ectopia de cristalin AD.*

Genetică: *gena FBN1 este localizată pe 15q15 şi se transmite autosomal dominant. Bolnavii au risc de 50% de a avea un copil afectat cu sindrom Marfan.*

Diagnostic: *Pentru afirmarea diagnosticului de Sindrom Marfan este necesară îndeplinirea următoarelor condiţii:*

- ***Cazul index:*** *criterii majore în cel puţin două sisteme diferite şi implicarea unui al treilea;*
- ***Membri ai familiei:*** *prezenţa unui criteriu major şi anamneza familială pozitivă*

Diagnostic prenatal, screening neonatal: *posibil în cazurile cu risc, prin analiza mutaţiei sau studii de înlănţuire. Nu se foloseşte pe scară largă.*

Prognostic: *rezervat datorită afectării cardio- vasculare.*

Tratament: *medical (beta blocante, pentru a încetini progresia dilataţiei aortice; profilaxie cu antibiotice, pentru profilaxia unei endocardite) şi chirurgical pentru complicaţiile cardio- vasculare şi osteo- articulare.*

Toate modificările fenotipice din sindromul Marfan sunt rezultatul unei singure mutaţii genice, ce se transmite autosomal dominant. Aparent, în acest caz există o abatere de la regula "o genă → un caracter" dar explicaţia efectelor multiple produse de o singură genă este (astăzi) simplă: mutaţia genică determină un defect în structura primară a fibrilinei, componentă majoră a ţesutului conjunctiv. Manifestările multiple, produse prin alterarea ţesutului conjunctiv în diferite

[2] Prin sindrom se înţelege un ansamblu de semne / simptome care definesc o anumită entitate clinică sau un anumit mecanism patogenic.

teritorii, au o legătură patogenică (un mecanism comun). În acest caz *pleiotropia este relaţională*. Într-un alt sindrom pleiotrop, **sindromul Treacher-Collins,** perturbarea dezvoltării fetale a celui de al doilea arc branhial va produce modificări regionale corelate în structurile ce se dezvoltă din acest arc: ureche, maxilar superior şi mandibulă; pleiotropia este evident relaţională[3].

Pentru numeroase afecţiuni pleiotrope conexiunea dintre diferite manifestări nu este nici evidentă şi nici bine înţeleasă. În aceste cazuri se vorbeşte de o *pleiotropie nerelaţională.* De ex., în **sindromul Bardet-Biedl** nu există (încă) o legătură patogenică evidentă între diferitele sale semne: polidactilie, obezitate, surditate, hipogonadism, retinită pigmentară şi retard mintal. Această "secvenţă" naturală de modificări (care apar succesiv, la vârste diferite) este produsă însă de o singură cauză: o mutaţie recesivă a unei perechi de gene alele (homozigotă). Progresul posibilităţilor actuale de explorare şi analiză va elucida probabil mecanismul comun al manifestărilor multiple în pleiotropia nerelaţională. Recent, în unele sindroame considerate pleiotrope s-au evidenţiat microdeleţii cromosomice (vezi capitolul 10.C.3); de ex. **sindromul WAGR** (*Wilms tumor-aniridia-genital defects-retardation syndrom* produs de o microdeleţie în regiunea 11p13). Pierderea mai multor gene diferite dar vecine, situate în aceiaşi regiune cromosomică, ar explica diversitatea şi lipsa de corelaţie a manifestărilor clinice. Aceste cazuri numite şi *"sindroame ale genelor contigue"* (sau învecinate) ies însă din "sfera" pleiotropiei, care se referă, prin definiţie, la efectele multiple ale unei singure gene.

Trebuie să subliniem faptul că în practica medicală sindroamele pleiotrope ridică probleme dificile de diagnostic pentru că semnele (care în ansamblu lor pun diagnosticul de sindrom) nu sunt prezente totdeauna în totalitatea lor (fie că unele nu se manifestă decât la anumite vârste, fie că pur şi simplu nu apar, datorită unei expresivităţi variabile).

4. INTERACŢIUNILE GENEI

Expresia fenotipică a unei gene poate depinde de: interacţiunile cu gena alelă (situată în acelaşi locus pe cromosomul omolog), influenţa altor gene şi/sau acţiunea mediului.

4.1. INTERACŢIUNILE ALELICE

Genele alele, situate în loci omologi, pot fi identice (la *homozigoţi*) sau diferite (la *heterozigoţi*). În stare heterozigotă (*A/a*)[4] manifestarea genelor alele depinde de relaţiile "de forţă" care se stabilesc între ele. Uneori se manifestă fenotipic numai una din genele alele şi atunci gena şi caracterul corespunzător (*A*) sunt numite **dominante**. Gena (*a*) care nu se exprimă în această situaţie se numeşte **recesivă**; ea se manifestă numai în stare homozigotă (*a/a*) sau la hemizigoţi X^aY). Alteori, la heterozigoţi se manifestă fenotipic ambele gene alele; în această situaţie genele sunt **codominante**. De ex., intre alelele *A1, A2, B* şi *0* ale locusului grup sanguin AB0 se stabilesc următoarele relaţii de dominanţă şi recesivitate: genele *A1, A2* şi *B* sunt dominante faţă de gena 0. De aceea, genotipurile *A1/o, A2/o* şi *B/o* vor corespunde grupelor A1, A2 şi respectiv B; fenotipul 0 va fi determinat de genele recesive *o/o*; gena *A1* este dominantă faţă de *A2* şi genotipil *A1/A2* va determina fenotipul A1; genele *A1, A2* şi *B* sunt codominante între ele, producând fenotipul A1B sau A2B.

Este important de precizat că noţiunile de dominanţă şi recesivitate sunt valabile pentru caracter, se referă deci la fenotip: genele sunt clasificate ca *dominante sau recesive pe baza expresiei lor fenotipice.* Totuşi, aşa cum vom vedea mai departe (Capitolul 4.B.1), la nivel

[3] Vom vedea mai târziu că există şi alte explicaţii patogenice ale sindroamelor cu pleiotropie; de ex. interferenţa unor căi metabolice interconectate, ramificate.

[4] La scrierea concisă a unui genotip (de ex. A/a; AB/ab) linia ce separă simbolurile genelor ne arată că acestea sunt dispuse, separate, pe cromosomi omologi distincţi.

molecular sau biochimic nu se poate face nici o distincţie între genele "dominante" sau "recesive", deoarece de cele mai multe ori *ambele tipuri de gene se manifestă*, codifică o proteină.

În sfârşit, vom menţiona că dominanţa poate fi *completă*, atunci când fenotipul heterozigotului *A/a* este identic cu cel al homozigotului *A/A* (de ex., în sindromul Marfan) sau *incompletă* (parţială)[5], când fenotipul heterozigotului *A/a* este intermediar între cel al homozigoţilor *A/A* şi *a/a*; deaceea în unele boli cu transmitere dominantă (de ex., hipercolesterolemia familială (vezi capitolul 11.E.1) homozigoţii *A/A* sunt mult mai grav afectaţi decât heterozigoţii *A/a*.

4.2. INTERACŢIUNILE NEALELICE

Expresia fenotipică a unei gene nu depinde întotdeauna numai de gena însăşi, fiind deseori influenţată de acţiunea altei/altor gene (nealele), deci de "fondul genetic" al organismului, la care se poate adăuga şi efectul unor factori de mediu. Aceste acţiuni determină gradul de *penetranţă şi expresivitate* a unei gene sau sunt implicate în fenomenul de *epistazie*.

a. **Penetranţa** defineşte probabilitatea unei gene mutante de a se manifesta fenotipic (indiferent de intensitate). Este o noţiune cantitativă (de tipul "tot sau nimic") valabilă în special pentru genele dominante[6], în stare heterozigotă. Multe gene au o *penetranţă completă,* puternică, şi se manifestă ori de câte ori există în genotip. Există însă gene mutante care au o *penetranţă incompletă*, redusă. În aceste cazuri, unele persoane (de ex. III.3 din figura 4.2) posedă gena anormală, ce produce **camptodactilia**, care nu se poate manifesta fenotipic ("nonpenetranţă") dar se transmite la urmaşi, unde se exprimă mai mult sau mai puţin complet; se realizează astfel "un salt" peste o generaţie.

Cauzele penetranţei incomplete, reduse, nu sunt clare dar se discută *efectul antagonic* al unor gene (*"supresoare"* sau *"epistatice"*) şi/sau al unor factori de mediu. Asupra fenomenului de penetranţă vom reveni mai pe larg ulterior (vezi capitolul 5.D.5); vom preciza însă că penetranţa este un termen *clinic* ce poate fi influenţat de vârstă şi sex, precum şi de capacitatea de explorare a fenotipului pacientului.

b. **Expresivitatea** reprezintă gradul (intensitatea sau severitatea) de manifestare clinică (fenotipică) a unei gene mutante şi penetrante la bolnavii din aceeaşi familie (figura 4.2) sau din familii diferite. Expresivitatea, spre deosebire de penetranţă, este o noţiune *calitativă.*

Deseori genele dominante cu efecte multiple (pleiotrope) se manifestă diferit la persoane cu acelaşi genotip (*A/n*). În aceste cazuri expresivitatea variabilă poate interesa: spectrul semnelor (anomaliilor) manifeste, severitatea, vârsta de debut a bolii sau a unor elemente componente. La bolnavii diferiţi din aceeaşi familie se pot întâlni forme complete de boală, forme parţiale sau fruste (oligo- / monosimptomatice). De ex., la bolnavii cu **sindrom Marfan** pot să nu apară toate anomaliile celor trei sisteme afectate (schelet, ochi, aparat cardiovascular) sau severitatea clinică poate să fie diferită. De menţionat că expresivitatea variabilă este frecventă în bolile dominante autosomale pleiotrope, dar se poate întâlni la toate bolile ereditare, indiferent de modul de transmitere.

Cauzele expresivităţii variabile nu sunt deobicei cunoscute (vezi şi 5.D.5). Se invocă *factori de mediu* ce influentează intensitatea de manifestare a bolii, interacţiunea genei boală cu alte gene, numite **modificatoare** şi în final mutaţii diferite (ca localizare si efecte) în aceiaşi genă (*"heterogenitate alelică"*). O dovadă indirectă a existenţei genelor modificatoare o reprezintă expresia mai frecventă sau exclusivă a unor caractere (determinate de gene autosomale) la un anumit sex. De ex: calviţia frontală, guta şi keratoza palmoplantară - mai

[5] Dominanţa incompletă se mai numeşte semidominanţă.

[6] Se consideră că fenomenul de penetranţă poate interesa şi gene recesive; în această situaţie pacientul homozigot (aa) care ar trebui să manifeste boala este sănătos şi greu de deosebit de heterozigotul (Na) normal.

frecvente la bărbaţi şi aplazia şmalţului dentar sau căderea precoce a dinţilor - mai frecvente la femei.

Aşa cum am precizat, penetranţa şi expresivitatea unor gene mutante sunt *termeni clinici*. Cunoaşterea lor are o deosebită importanţă practică deoarece poate influenţa calitatea diagnosticului şi, funcţie de aceasta, corectitudinea sfatului genetic: neindentificarea prezenţei unei gene mutante (nonpenetranţă sau manifestare oligo / monosimptomatică) la o persoană purtătoare va duce la o evaluare greşită a riscului de recurenţă la urmaşi.

Un alt fenomen de interacţiune genică se referă la situaţiile în care două sau mai multe gene interacţionează în realizarea normală a unui caracter; dacă una din gene suferă o mutaţie ea suprimă efectul celeilalte / celorlalte gene. Fenomenul în care o genă interferează / suprimă expresia fenotipică a unei alte gene nealele se numeşte **epistazie**. De exemplu, dezvoltarea şi funcţia normală a aparatului auditiv este dependentă de implicarea a două perechi de gene: una (*D/D*) controlează formarea normală a cohleei, iar cealaltă (*E/E*) - dezvoltarea nervului auditiv. Mutaţia uneia din aceste gene (*d/d* sau e/e) produce surditate chiar dacă cealaltă pereche de gene este normală; o cohlee normală (*D/D*) nu poate funcţiona dacă nu se dezvoltă nervul acustic (*e/e*) şi invers nedezvoltarea cohleei (*d/d*) determină surditate (de percepţie) chiar dacă nervul este integru (*E/E*). Un alt exemplu de epistazie îl reprezintă **statusul secretor**, definit prin capacitatea unor indivizi ("secretori") de a elimina / secreta antigenele de grup sanguin ABO în secreţii (salivă, lacrimi, lichid spermatic etc.). Această proprietate este determinată de o genă dominantă *Se/-* ; în stare recesivă (*se/se*) nu se produc aceste antigene si indivizii sunt "nesecretori", chiar dacă există genele AB0.

Epistazia poate fi realizată fie de prezenţa unei gene supresoare (epistatice) în stare recesivă (aa), fie de prezenţa unei gene dominante (An) şi de aceea există o epistazie recesivă, în primul caz, sau o epistazie dominantă, în al doilea caz. Indiferent de tip se pune firesc întrebarea: cum poate o genă să afecteze expresia altor gene? În exemplul surdităţii rezultă evident că dezvoltarea anormală a caracterului (aparat auditiv, în acest caz) depinde de dezvoltarea /realizarea ordonată a unor părţi anatomice componente (cohlee; nerv acustic), fiecare controlată de o genă distinctă. În alte cazuri de interacţiune genică este vorba de o cale metabolică simplă sau ramificată, în care fiecare etapă este controlată de o enzimă distinctă, codificată de o anumită genă; mutaţia unei gene şi absenţa unei enzime blochează calea metabolică şi împiedică apariţia produsului final, chiar dacă celelalte gene şi enzime sunt normale. În cazul caracterului secretor gena Se/- şi genele ABO acţionează în diferite etape ale formării antigenelor de grup sanguin într-o formă hidrosolubilă (vezi 4.B.5).

4.3. INTERACŢIUNILE GENELOR CU MEDIUL

Nu trebuie să uităm că activităţile tuturor genelor au loc în mediul celular, care la rândul lui este influenţat de factori ai mediului extern. De aceea, gradul de penetranţă şi expresivitate a multor gene depinde, într-o oarecare măsură, de factorii de mediu (fizici sau chimici). La Drosophila, variaţiile de temperatură pot reduce penetranţa unor gene de la 100% la zero sau pot influenţa intensitatea lor de expresivitate. La om, expresivitatea variabilă a polidactiliei este foarte probabil condiţionată de mediu: faptul că o persoană poate avea un deget suplimentar complet la o mână şi nici unul sau numai un rudiment la cealaltă mână sau la picior pledează pentru acţiunea unui factor de mediu uterin care a interferat expresivitatea genei.

Să ne reamintim că efectele nocive ale fenilcetonuriei (PKU) se manifestă numai atunci când se acumulează fenilalamină prin aport alimentar (vezi capitolul 1.B.2.1.c); eliminarea acestui aminoacid din alimentaţie previne retardul mintal pe care-l poate cauza expresia completă a genei pentru PKU. Răspunsul variabil al diferitelor persoane la anumite medicamente (farmacogenetica), reprezintă un alt exemplu convingător al interacţiunii dintre gene şi factorii de mediu. Este deja cunoscut (vezi capitolul 1.B.2.3.b) efectul antimalaricelor, sulfamidelor sau al consumului de bob la persoanele cu **deficienţă în G6PD**: absenţa enzimei, de obicei

nemanifestă, devine evidentă (printr-o criză de anemie hemolitică) după acţiunea acestor factori de mediu.

5. HETEROGENITATEA GENETICĂ

Numeroase boli ereditare umane, indiferent de modul lor de transmitere, prezintă o **heterogenitate genetică**. Termenul se referă de regulă la situaţia în care *mutaţii genice (genotipuri) diferite determină un fenotip identic sau asemănător.* Heterogenitatea poate fi produsă de mutaţii în loci diferiţi (heterogenitate de locus sau nonalelică) sau mutaţii diferite în acelaşi locus (heterogenitate alelică) sau de ambele.

a. **Heterogenitatea de locus** / nonalelică poate fi uşor demonstrată prin analiza arborilor genealogici ai diferitelor familii în care o boală genetică se manifestă identic; această analiză genealogică va evidenţia modalităţi diferite de transmitere ale aceleiaşi afecţiuni, dovedind existenţa unor mutaţii diferite în loci diferiţi. Ele vor fi apoi confirmate prin studiul ADN
De ex., **retinita pigmentară** - o cauză frecventă de afectare şi pierdere a vederii, datorată degenerării retiniene însoţită de o distribuţie anormală a pigmentului în retină - se prezintă sub forme de transmitere ereditară diferite: autosomal dominante (12 forme), autosomal recesive (5 forme) şi legat de X (trei forme). Au fost localizate peste 20 de regiuni cromosomice[7] ce conţin loci care produc retinita pigmentară (dintre aceştia 8 au fost deja identificaţi).

Există multe alte exemple de heterogenitate de locus: albinismul, surditatea congenitală, hipotiroidia congenitală etc. În prezent, analiza genotipică moleculară (la nivel ADN) a demonstrat că multe afecţiuni cu un mod unic de transmitere pot fi heterogene. De exemplu, nanismul hipofizar, osteogenesis imperfecta, rinichiul polichistic etc. pot fi produse de mutaţii în loci diferiţi (tabelul 4.1). Evident, în aceeaşi familie toţi bolnavii vor avea acelaşi genotip sau, mai exact, aceeaşi mutaţie.

Tabel 4.1 Exemple de boli în care există heterogenitate de locus

Boala	Descriere	Cromosomii pe care sunt localizaţi locii-boală
Boala Alzheimer	Demenţă progresivă	1, 4, 19, 21
Boala Charcot-Marie-Tooth	Neuropatie periferică	1, 5, 8, 11, 17, X
Boala polichistică renală a adultului (ADPKD)	Acumulare de chisti renali ducând la insuficienţă renală cronică	16, 4
Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (AD)	Cancer colorectal	2p, 2q, 3, 7
Cancer de sân ereditar (AD)	Predispoziţie la cancer de sân sau ovar aparut precoce	13, 17
Melanomul familial	Cancer piele	1, 9
Osteogenesis imperfecta	Boala oaselor de sticlă	7 şi 17
Retinita pigmentară	Retinopatie progresivă şi pierderea vederii	> 20 regiuni cromosomice
Scleroza tuberoasă	Convulsii, angiofibroame faciale, macule hipopigmentate pe piele, retard mintal	9, 16

b. **Heterogenitatea alelică** este reprezentată de mutaţii diferite în acelaşi locus (aceeaşi genă) care produc fenotipuri asemănătoare clinic, deosebite doar prin intensitatea de manifestare a bolii. Un exemplu caracteristic îl reprezintă *distrofia musculară Duchenne şi boala Becker* -

[7] Dacă adăugăm şi formele sindromice de retinită pigmentară (asociată cu alte anomalii / manifestări) există peste 30 de boli diferite ce se manifestă cu retinită pigmentară

afecţiuni caracterizate prin atrofie musculară progresivă şi inexorabilă; ele sunt determinate de mutaţii diferite ale aceleiaşi gene (locus), situat pe cromosomul X. Deşi efectele fenotipice sunt asemănătoare, boala Becker este o formă moderată de distrofie musculară. Explicaţia acestui fenomen este că unele alele nu abolesc complet sinteza şi deci funcţia unei proteine.

Există numeroase alte exemple de heterogenitate alelică: mucoviscidoza (forme cu sau fără insuficienţă pancreatică), hemofilia A, beta-talasemia, neurofibromatoza, surditatea, boala Tay-Sachs etc. Se spune că *heterogenitatea alelică este o regulă* în bolile mendeliene la om. De aceea în multe boli recesive persoanele afectate nu au genotipuri pur homozigote; ele sunt **heterozigoţi compuşi** deoarece au două alele mutante diferite (*a1/a2*).

În unele afecţiuni genetice (de exemplu, mucopolizaharidozele, homocistinuria, osteogenesis imperfecta, surditatea congenitală etc.) se întâlnesc ambele forme de heterogenitate, alelică şi nonalelică (de locus). Un exemplu sugestiv îl reprezintă **sindromul Ehlers-Danlos** (SED.) (vezi capitolul 11.B.5), o afecţiune a ţesutului conjunctiv (produsă printr-un defect în structura colagenului) caracterizată prin hiperelasticitate cutanată, hiperlaxitate articulară şi fragilitate tisulară crescută. SED prezintă mai multe subtipuri clinice definite şi prin alte semne clinice, care le diferenţiază. În familii diferite SED se transmite diferit - autosomal dominant sau recesiv, legat de X - demonstrând o veritabilă heterogenitate de locus. Analiza clinică şi moleculară relevă cel puţin 10 tipuri distincte de SED şi o amplă heterogenitate alelică; există, spre exemplu, şase forme autosomal dominante, din care cel puţin o parte sunt produse de mutaţii diferite ale aceluiaşi locus (variante alelice).

c. Heterogenitatea clinică. Trebuie să menţionăm că heterogenitatea alelică nu produce totdeauna fenotipuri asemănătoare. Din contra, mutaţii diferite ce interesează *aceeaşi genă* (în exoni diferiţi) pot avea un aspect clinic variat, producând uneori chiar *boli diferite*; acest fenomen se numeşte *heterogenitate clinică sau fenotipică*. De exemplu, mutaţii diferite în gena pentru β globină produc sicklemia (AR), β talassemia (AR), hemoglobina instabilă (AD) şi methemoglobinemia (AD). Sindromul Hurler şi sindromul Scheie sunt două forme diferite de mucopolizaharidoză (boală de stocaj a mucopolizaharidelor în lizozomi) deşi sunt produse de variante alelice ale aceleiaşi gene (care afectează aceiaşi enzimă, alfa-L-iduronidaza) distinte. Un alt exemplu: unele mutaţii în **gena RET** (11q12) (ce codifică un receptor tirozinkinazic, implicat în migrarea celulelor din creasta neurală) care se însoţesc de *pierderea funcţiei* genei, produc o insuficientă dezvoltare a ganglionilor colonici şi secundar distensia colonului, tulburări de motilitate şi constipaţie severă cronică (**boala Hirschprung**); alte mutaţii în aceiaşi genă, care se însoţesc de *câştig de funcţie*, produc trei forme de cancer ereditar al glandelor tiroidă şi suprarenală (neoplaziile endocrine multiple *MEN2A* şi *MEN2B* precum şi *cancer medular tiroidian*); un al treilea grup de mutaţii în gena *RET* produc ambele boli la acelaşi individ. Din exemplele prezentate mai sus rezultă că heterogenitatea clinică este frecventă şi importantă; explicaţia cea mai simplă a acestui fenomen este că exoni şi, implicit, domenii distincte ale unei proteine pot îndeplini funcţii diferite, iar prin mutaţii variate în aceeaşi genă sunt afectate aceste funcţii, rezultând boli diferite.

d. Importanţa practică a fenomenului de heterogenitate genetică şi clinică.

Fenomenul de heterogenitate genetică, frecvent intâlnit în eredopatologie, are o deosebită importanţă practică pentru acurateţea diagnosticului clinic şi etiologic, tratamentul diferenţiat al unei manifestări clinice produsă de genotipuri diferite şi, bineînţeles, pentru realizarea unui sfat genetic corect (în funcţie de modul diferit de transmitere). Iată succint câteva exemple şi deci argumente care demonstrează importanţa practică a cunoaşterii acestui fenomen.

- *Tratamentul.* În cazul unei afecţiuni cu heterogenitate genetică (de ex., hemofilia A şi B; hiperfenilalaninemie) diagnosticul va fi incomplet dacă nu se precizează tipul etiopatogenic şi acest lucru poate avea consecinţe negative în tratament; aplicarea unei terapii identice unor boli genotipic diferite, dar cu aceeaşi manifestare clinică, riscă să fie deseori fără succes. De exemplu, hiperfenilalaninemia, care produce secundar debilitate mintală, poate fi cauzată de o

deficienţă a enzimei fenilalaninhidroxilaza (în PKU, forma clasică) sau de unele anomalii ale metabolismului biopterinei; PKU poate fi tratată cu succes prin restricţia dietetică a fenilalaninei în timp ce în a doua situaţie acelaşi tratament este ineficace.

- *Prognosticul* bolilor cu heterogenitate alelică (de ex., distrofie musculară Duchenne şi distrofie musculară Becker) este deasemeni diferit.
- *Sfatul genetic.* Riscul de recurenţă a retinitei pigmentare este 50% în formele autosomal dominante, 25% în cazurile autosomal recesive şi 50% la băieţi în formele recesive legate de X; fără precizarea modului de transmitere, deci a diagnosticului etiologic, sfatul genetic în retinita pigmentară nu poate fi corect realizat.

B. CONCEPŢIA ACTUALĂ DESPRE FUNCŢIA GENEI

1. GENELE CONTROLEAZĂ SINTEZA PROTEINELOR

Explicând funcţia genei prin relaţia "o genă → un caracter", genetica clasică nu a putut răspunde la întrebarea: *"cum acţionează genele în formarea, dezvoltarea şi funcţia organismului?"*.

Prima formulare a unui răspuns corect aparţine unui medic englez sir Archibald Garrod, care postulează o legătură specifică între gene şi proteine. În 1902, Garrod descrie **alcaptonuria**, o boală ereditară care se transmite în succesiunea generaţiilor în concordanţă cu legile lui Mendel. Bolnavii suferă de artrită şi urina lor devine neagră după expunerea la aer. Garrod a presupus că boala este determinată de un *bloc biochimic* produs de lipsa enzimei care metabolizează acidul homogentizic (figura 4.3). Simptomatologia bolii este rezultatul *acumulării* acidului homogentizic în organism ca urmare a "*barajului*" căii metabolice. Prin acelaşi mecanism el explică mecanismul altor trei boli ereditare, inclusiv **albinismul** unde a descris un bloc metabolic pe calea de transformare a tirozinei în melanină. Garrod a stabilit astfel o relaţie clară între gene şi enzime şi a introdus în medicină conceptul de **"erori înnăscute de metabolism"** (prefigurând era patologiei molecuare).

Din păcate, ca şi în cazul lui Mendel, importanţa remarcabilelor cercetări de genetică ale lui Garrod n-a fost percepută nici de medici şi nici de biologi. Abia peste 40 de ani, experienţele efectuate de Beadle şi Tatum la *Neurospora crasa* au demonstrat fără echivoc relaţia "o genă → o enzimă", aducându-le autorilor un binemeritat Premiu Nobel (1958).

Beadle şi Tatum (1944) au studiat metabolismul triptofanului şi argininei la Neurospora crasa (mucegaiul alb). Ei au stabilit etapele biosintezei triptofanului din arginină şi au demonstrat că fiecare etapă este catalizată de o enzimă diferită. Apoi, au iradiat sporii ciupercii şi cultivându-i pe medii nutritive au obţinut mai multe variante (mutante); ele nu puteau sintetiza triptofanul deoarece una din etape era blocată, fie prin lipsa enzimei, fie prin inactivarea ei, produsă de modificarea structurii sale. Toate aceste modificări erau *ereditare,* reprezentând consecinţe ale mutaţiilor produse prin iradiere. Rezultă evident că genele îşi exercită efectul lor fenotipic prin controlul sintezei unor enzime (proteine).

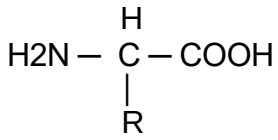
Numeroase alte dovezi obţinute la microorganisme, plante, animale şi om au demonstrat incontestabil că genele îşi exercită controlul asupra organismului prin influenţa lor asupra formării proteinelor. Prin enorma lor diversitate şi complexitate structurală, ca şi prin rolul lor structural, catalitic (enzime) sau reglator, proteinele determina aproape toate caracterele organismului. Relaţia *"o genă → o enzima (proteină)"* a devenit în scurt timp *"o genă → un polipeptid",* deoarece unele proteine formate din două sau mai multe polipeptide (de ex., hemoglobina) sunt codificate de gene distincte, care controlează fiecare sinteza unui polipeptid.

Relaţia "o genă - un polipeptid" nu este general valabilă deoarece unele gene codifică diferite tipuri de ARN; de aceea gena a fost definită ca un segment de ADN ce determină sinteza unui produs funcţional. Genele care codifică proteine sunt numite şi gene structurale.

2. STRUCTURA PROTEINELOR

Întrucât proteinele reprezintă "suportul" biochimic al caracterelor noastre fenotipice şi sinteza lor este determinată genetic, pentru a înţelege mecanismul complex al relaţiei *"o genă → o proteină"* sunt utile câteva noţiuni sintetice despre stuctura acestor compuşi organici, cu rol vital în organism.

Proteinele sunt alcătuite din una sau mai multe catene polipeptidice, formate prin polimerizarea a 20 de tipuri de aminoacizi. Deşi diferiţi în complexitatea lor, ei au la bază o structură comună de tipul:



Radicalul R diferă de la un aminoacid la altul si determină structura şi proprietăţile aminoacidului. Aminoacizii se unesc între ei prin legături peptidice (figura 4.4) formând o catenă liniară polipeptidică; aceasta are "o coloană vertebrală" (în zig-zag) alcătuită din −C−N−, pe care se fixează lateral şi în mod alternativ gruparea R (figura 4.5). *Numărul, tipul şi secvenţa aminoacizilor în lanţul polipeptidic alcătuiesc structura primară a polipeptidului (proteinei).*

Secvenţa aminoacizilor dintr-o proteină reprezintă elementul esenţial al structurii sale, deoarece: *este unică, constantă, specifică* fiecărei proteine şi este *determinată genetic*. Secvenţa aminoacizilor *determină funcţia proteinei şi antigenicitatea ei* deoarece prin interacţiunile dintre aminoacizii situaţi în diferite situsuri din structura polipeptidului se realizează structurile spaţiale, tridimensionale, ce determină activitatea sa biologică.

Prin legături de hidrogen între aminoacizii învecinaţi se formează, în anumite porţiuni/zone ale proteinei *structuri secundare* de tip alfa (în elice) sau beta (foaie pliată) (figura 4.6). Prin interacţiuni între aminoacizi din diferite poziţii ale catenei aceasta capătă spontan o configuraţie tridimensională, spaţială, ce reprezintă *structura terţiară* a polipeptidului (figura 4.7).. Unele proteine au două sau mai multe catene identice sau diferite, ce formează singure sau împreună cu alte molecule neproteice complexe macromoleculare (*structura cuaternară*) *Configuraţia spaţială caracteristică a unei proteine determină activitatea ei funcţională*[8]. De notat că proteinele funcţionale nu sunt totdeauna sintetizate în forma lor activă. Ele suferă modificări post-translaţionale care determină *activarea* proteinei.

Aminoacizii care interacţionează între ei pentru a forma structura tridimensională, biologic activă, sau care alcătuiesc aşa numitele "situsuri funcţionale" ale proteinei sunt deosebit de importanţi; înlocuirea lor, în urma unor mutaţii, duce la o *proteină anormală* (cu o structură spaţială modificată) şi la pierderea activităţii proteinei. Înlocuirea altor aminoacizi, neimplicaţi în legăturile spaţiale sau în situsul funcţional este mai puţin importantă şi poate produce *variante proteice normale*.

3. GENELE STRUCTURALE DETERMINĂ SECVENŢA AMINOACIZILOR ÎN PROTEINĂ

Genele care codifică proteine conţin mesajul codificat necesar pentru asamblarea specifică (într-o anumită ordine) a aminoacizilor în proteină. Această relaţie a fost elegant demonstrată prin studiul mutaţiilor care produc diferite tipuri de hemoglobină anormală şi, în special, prin cercetarea drepanocitozei sau sicklemiei, o anemie hemolitică cu hematii în formă de seceră ("falciforme").

Drepanocitoza (sicklemia) este o boală genetică, cu transmitere autosomal recesivă, frecventă în populaţia originară din Africa tropicală (1:500 n.n), precum şi în bazinul Mediteranean, Orientul Mijlociu şi India. Această distribuţie geografică caracteristică se explică prin avantajul selectiv faţă de malarie pe care îl au heterozigoţii sănătoşi (1 : 25 n.n) protejaţi de formele grave de paludism.

---

[8] Prin diverse tratamente fizico-chimice legăturile dintre diferiţi aminoacizi ce formează structura terţiară se pot rupe şi proteina "denaturată" îşi pierde activitatea biologică.

Boala se manifestă la homozigoţi (*a/a*) printr-o *anemie hemolitică severă*, produsă prin distrugerea hematiilor cu *formă anormală "în seceră"* (figura 4.8.a); aceste hematii se formează în condiţiile scăderii tensiunii (concentraţiei) oxigenului în anumite teritorii capilare. Formele acute se însoţesc de dureri în mâini / picioare sau alte organe (splină, mezenter, rinichi etc.), produse de *microinfarcte* prin ocluzia capilarelor de către hematiile în seceră, care au o deformabilitate redusă. *Hemoliza* se asociază cu *splenomegalie* şi infarcte splenice recurente care determină pierderea funcţiei ei imune şi cu susceptibilitatea crescută la unele infecţii bacteriene (pulmonare), cauza principală de deces. Heterozigoţii (*N/a*) prezintă "*trăsătura sicklemică*"; obişnuit ei sunt sănătoşi, dar scăderea brutală a concentraţiei O_2 (altitudine) poate produce prin "sicklizarea" hematiilor, o anemie hemolitică acută şi infarcte splenice.

În 1949, Pauling şi colaboratorii săi au demonstrat existenţa unei anomalii a hemoglobinei din eritrocitele "în seceră", numită HbS, care se deosebeşte electroforetic de HbA (normală) deoarece, datorită unei mutaţii genice, moleculele lor de beta-globină sunt diferite (figura 4.8.b). Cercetătorii au stabilit că la persoanele heterozigote (*N/a*), cu trăsătură sicklemică, există un amestec de HbA şi HbS. Ulterior (1956), Ingram a descoperit că HbS are unul din cei 146 de aminoacizi ai catenei beta, şi anume cel din poziţia 6 înlocuit cu un alt aminoacid (beta 6 acid glutamic→valină). Această unică schimbare a moleculei de Hb produce modificarea formei eritrocitului şi toate manifestările clinice ale bolii. Pauling şi Ingram au demonstrat astfel pentru prima dată că *mutaţia unei gene strcturale poate produce o substituţie a unui aminoacid în proteina* corespunzătoare şi au postulat că drepanocitoza sau sicklemia reprezintă prototipul de "**boală moleculară**".

După 1975, identificarea, localizarea şi secvenţarea genei normale pentru beta-globină şi a alelei sale mutante (β^S) au stabilit cu precizie tipul de mutaţie: în codonul 6 (GAG) al genei beta-globinei, adenina este înlocuită cu timina, formând codonul GTG care semnifică valina. Iată deci, că modificarea unui singur nucleotid din cele trei miliarde de nucleotide care alcătuiesc genomul uman este cauza modificărilor patologice observate la bolnavii cu drepanocitoză. Explicaţia patogenică a acestei boli moleculare este acum simplă (figura 4.8.c): moleculele de HbS conţinând subunitatea beta mutantă fixează în mod normal O_2 dar în sângele deoxigenat ele sunt relativ insolubile, comparativ cu HbA normală; această proprietate fizică stă la baza fenomenului de sicklizare. În condiţiile scăderii concentraţiei de oxigen molecula de HbS agregă şi formează polimeri având forma unor fibre care distorsionează eritrocitul şi-l fac mai puţin deformabil ca în mod normal; el nu mai este capabil să traverseze prin capilarele fine (cu un diametru inferior celui al hematiei), blochează fluxul sanguin şi produce hipoxie locală (micro-infarcte dureroase). Eritrocitele în seceră se hemolizează (în splină) generând o anemie cronică.

Studii ulterioare au evidenţiat numeroase alte tipuri de hemoglobinopatii ereditare în care schimbarea structurii Hb era rezultatul substituţiei unui singur aminoacid. De exemplu, HbC rezultă printr-o substituţie nucleotidică în acelaşi codon 6 al genei bet-globinei, care duce la înlocuirea acidului glutamic cu lizina. A devenit astfel evident şi unanim acceptat că genele determină secvenţa primară a aminoacizilor dintr-o proteină specifică.

Descrierea amplă a defectului molecular în drepanocitoză permite câteva concluzii importante privind concepţia actuală despre funcţia genei:

(1) Genele care codifică proteine conţin (sub forma unei secvenţe de nucleotide) informaţia genetică necesară pentru *asamblarea specifică (într-o anumită ordine) a aminoacizilor* într-o proteină specifică; mutaţiile genice produc o schimbare (substituţie) a secvenţei unui/unor codon(i) şi secundar o modificare a structurii proteinei, care poate genera o *boală moleculară*;

(2) În acţiunea genei se pot identifica trei categorii de efecte corelate: *efectul primar*, la nivel molecular (proteină); *efectul secundar*, la nivel celular şi *efectele terţiare* multiple (pleiotropie), la nivel fenotipic, de organ / organism (semne şi simptome). În practica medicală se recunosc clinic sau paraclinic efectele terţiare ale genei mutante adică boala ereditară cu diversele sale manifestări; efectele primare (proteina anormală) nu sunt cunoscute în multe boli monogenice

dar tehnicile recente de analiză a structurii şi funcţiei genei vor rezolva enigma acestor "pete albe";
(3). La heterozigoţi (*N/a*) se manifestă (exprimă) la nivel molecular ambele gene şi persoanele heterozigote cu trăsătura sicklemică (genotip A/S) produc şi HbA şi HbS. Rezultă că *noţiunile de dominant şi recesiv NU sunt valabile la nivel molecular, cu numai la nivel fenotipic* (de organism);
(4). Expresia ambelor gene alele la heterozigoţi permite identificarea lor, prin studiul efectelor primare şi uneori secundare (la nivel celular). *Depistarea heteozigoţilor* sănătoşi purtători de genă mutantă are o deosebită valoare practică în prevenirea naşterii unor homozigoţi bolnavi (doi părinţi heterozigoţi, *N/a*, au un risc de 25% de a avea un copil *a/a* homozigot, bolnav).
(5). Cunoaşterea modificării nucleotidice în gena mutantă care produce o boală moleculară permite, prin metodele actuale de analiză a ADN, *diagnosticul genotipic precoce* al bolii, fie prenatal fie postnatal, în stadiile asimptomatice. Se deschide, de asemenea, perspectivele unei terapii genice, prin inserţia unei gene normale pentru beta-globină în celulele unui pacient la care boala este consecinţa mutaţiei acestei gene.

4. RELAŢIA "O GENĂ → UN POLIPEPTID" ESTE MULT MAI COMPLEXĂ

Evoluţia cunoştinţelor despre structura moleculară a genei, bazată pe posibilitatea analizei ei directe, a evidenţiat o serie de fenomene care se abat de la relaţia fundamentală "o genă (de structură) → un polipeptid". În esenţă este vorba de situaţiile în care o genă poate produce *mai multe polipeptide* asemănatoare sau diferite sau invers, *mai multe gene distincte*, situate uneori la distanţă una de alta. O astfel de genă participă la sinteza unui singur polipeptid sau a unei proteine multipeptidice .

Primul fenomen, **"o genă → mai multe polipeptide"**, se realizează prin mecanisme diverse ce intervin în diferite etape ale expresiei genei (transcripţie, maturare, translaţie, procesarea postranslaţională a proteinelor). Fără a intra în detalii vom preciza că cel mai frecvent mecanism este *matisarea alternativă*. După cum ştim deja (capitolul 3.B.1), marea majoritate a genelor umane au o structură discontinuă, fiind alcătuite din exoni şi introni; în procesul de formare a ARNm matur din preARNm, intronii sunt excizaţi iar exonii sunt uniţi / legaţi unul de altul (matisare). Unele celule "decid" să folosească însă numai anumiţi exoni si astfel dintr-un mesager primar unic se pot produce (printr-o "selecţie" a exonilor şi "matisare alternativă"), în acelaşi ţesut sau în ţesuturi diferite, fie proteine înrudite, cu funcţie analogă – numite *isoforme* - (de ex: cele patru tipuri de bază ale mielinei, troponinei C, distrofinei etc) sau chiar proteine complet diferite ca funcţie (figura 4.9.). De exemplu, gena calcitoninei produce un transcript primar din care în celulele C ale tiroidei se formează ARNm pentru calcitonină iar în neuroni (creier), printr-o maturare diferită, se formează un mesager pentru un "polipeptid înnrudit" cu funcţie de tip neuromeditor. Fenomenul de matisare alternativă a jucat, foarte probabil, un rol important în evoluţie deoarece prin rearanjarea diferitelor segmente codante (exoni) din structura genei s-au produs proteine cu funcţii noi.

Aşsa cum vom vedea (vezi capitolul 4.B.) există şi alte mecanisme prin care o genă (ca unitate de transcripţie) poate produce o varietate de "produse". Alături de matisarea alternativă vom mai menţiona acum *folosirea alternativă a unuia dintre promotorii multipli* prin care rezultă isoforme cu diferite proprietăţi: expresia în diferite perioade ontogenetice, specificitatea tisulară, localizarea subcelulară, capacitatea funcţională. Un alt mecanism este *clivarea posttranslaţională* prin care dintr-un singur polipeptid "gigant" se produc, prin secţionarea, mai multe polipeptide "mici"; acest mecanism se întâlneşte în cazul sintezei unor hormoni dintr-un prohormon (de ex., *pro-opiomelanocortina* din care rezultă ACTH, γMSH, δMSH, γLPH, β-endorfina)

Al doilea fenomen, **"mai multe gene→un polipeptid"** se observă în cazul polipeptidelor alcătuite din regiuni diferite. De ex., lanţurile uşoare (L) şi grele (H) ale

imunoglobinelor prezintă o regiune variabilă (V) - care alcătuieşte situsul de recunoaştere si fixare al antigenului - şi o regiune constantă (C); ele sunt specificate de gene distincte, situate la distanţă pe acelaşi cromosom. În limfocitele B care produc anticorpi se produce o rearanjare (recombinare somatică) a genomului (vezi capitolul 15) şi o anumită genă V este asociată cu o gena C, formând o secvenţă completă funcţional ce codifică lanţul respectiv al imunoglobinei (figura 4.10).

5. INTERACŢIUNILE GENICE ÎN CONCEPŢIA ACTUALĂ

Concepţia clasică despre funcţia genei postulează că expresia fenotipică a unei gene este influenţată de alte gene alele sau nealele, precum şi de acţiunea mediului. Aceste interacţiuni sunt mult mai evidente la nivel molecular.

Interacţiunile alelice exprimate prin relaţiile de dominanţă-recesivitate dintre genele alele sunt valabile la nivel fenotipic, influenţând expresia unui caracter. La nivel molecular se manifestă de obicei ambele gene alele, producând o proteină normală sau anormală, în cazul genelor mutante. Uneori anumite gene nu au nici un efect primar (gene amorfe / silenţioase). De ex., gena 0 a sistemului de grup sanguin AB0 sau genele mutante recesive pentru agamaglobulinemie sau afibrinogenemie. La heterozigoţii *N/a*, gena mutantă *a* poate codifica o proteină (enzimă) nefuncţională; cantitatea totală de proteină / enzimă normală *se reduce la jumătate* fiind totuşi suficientă, în condiţii bazale, pentru a asigura o funcţie normală şi ca atare individul să fie (aparent) sănătos (vezi "trăsătura sicklemică").

Interacţiunile nealelice şi în special fenomenul de **epistazie** pot fi demonstrate mai convingător la nivel molecular, prin acţiunea coordonată a mai multor gene ce intervin în producerea unui compus final. Un frumos exemplu îl reprezintă formarea antigenelor ABH pe suprafaţa hematiilor şi în secreţii.

Antigenele A, B şi H sunt macromolecule complexe prezente sub formă alcool-solubilă (glicosfingolipide) pe suprafaţa hematiilor şi hidrosolubilă (glicoproteine) în secreţii, dar numai la persoanele "*secretoare*". Antigenele ABH eritrocitare sunt glicosfingolipide complexe care au o parte centrală fixată cu un capăt în membrana eritrocitului; pe acest "miez" se leagă lateral, în zona extramembranară, mai multe catene glucidice. Specificitatea antigenică este determinată de glucidul terminal. Formarea antigenelor A, B, H este determinată de acţiunea coordonată a genelor H, Se şi A,B,O[9] care, prin intermediul unor enzime (glicoziltransferaze), fixează diferite tipuri de glucide la axul sfingolipidic sau glicoproteic (figura 4.11).

- *Gena dominantă H* codifică o enzimă (fucoziltransferază) care acţionează asupra unui precursor şi adaugă o moleculă de fucoză, formând substanţa H.
- *Genele dominante A şi B* acţionează asupra substanţei H şi, prin intermediul unor transferaze specifice, fixează o moleculă de acetilgalactozamină (antigenul A) şi, respectiv, galactoză (antigenul B). *Gena recesivă 0* este inactivă, nu modifică substanţa H, care se va regăsi ca atare la persoanele de grup sanguin 0.
- S-a înregistrat şi situaţia foarte rară de homozigoţi (*h/h*) pentru gena H la care precursorul nu este transformat în substanţă H; genele A sau B, deşi există în stare normală nu au efect şi fenotipul (numit Bombay) corespunde grupei 0 (dar fără substanţă H).
- La secretori, alături de *gena H/* , acţionează şi *gena dominantă Se/* care va determina sinteza şi excreţia antigenelor A, B şi H; la nesecretori (*se/se*) efectul genei H este "anulat" prin acţiunea genelor *se/se* iar precursorul rămâne netransformat. Gena *Se/* are deci acţiune epistatică asupra genei H.

---

[9] Analiza moleculară a genelor A, B, 0 a fot recent realizată. Între alelele A şi B există o diferenţă de secvenţă de numai patru nucleotide. Alela 0 prezintă o deleţie a unui nucleotid care (fiind o mutaţie "frameshift") determină pierderea activităţii transferazice

Efectul mediului asupra expresiei genelor se manifestă în reglajul cantitativ (şi uneori calitativ) al sintezei proteinelor.

C. MECANISMELE MOLECULARE ALE EXPRESIEI GENICE

Expresia informaţiei genetice se realizează în toate celulele pe baza unui *flux informaţional, unidirecţional şi universal*[10], care se conformează dogmei centrale a geneticii: **ADN → ARNm → polipeptid (proteină)** (figura 4.12). Prima etapă a expresiei informaţiei ereditare este sinteza ARN (cu ajutorul unei ARN polimeraze ADN-dependente[11]), prin copierea informaţiei din ADN; această etapă are loc în *nucleu şi mitocondrii* şi se numeşte **transcripţie.** A doua etapă este sinteza unui polipetid, prin decodificarea (*"traducerea"*) informaţiei ARNm într-o secvenţă caracteristică de aminoacizi; acest proces are loc în citoplasmă, pe *ribosomi*, şi este denumit **translaţie.** Realizarea acestor etape se bazează pe **principiul coliniarităţii**: o secvenţă liniară de nucleotide din ADN este copiată (complementar) într-o secvenţă liniară de nucleotide în ARN; apoi ea este decodificată (prin *"citire"* în grupe de trei nucleotide numite codoni) într-o secvenţă, de asemenea, liniară de aminoacizi ce formează un polipeptid.

Înainte de a descrie mecanismele moleculare ale expresiei genice sunt utile următoarele precizări:

- *Numai o mică proporţie din ADN al celulelor eucariote este exprimat şi determină o proteină*. Este vorba de ADN genic codant (vezi capitolul 2.C.2.3.), iar din acesta diferite tipuri de celule diferenţiate transcriu numai anumite segmente de ADN (*unităţi de transcripţie*).
- Întregul proces al exprimării informaţiei genetice este supus unui riguros *control* care reglează *tipul de celulă* în care se produce sinteza proteinei, precum şi *momentul, cantitatea şi ritmul* acestui proces.
- Erorile mecanismelor moleculare ale exprimării informaţiei genetice vor genera, firesc, o serie de boli; descifrarea acestor mecanisme va creşte posibilităţile de diagnostic şi tratament.

1. TRANSCRIPŢIA

1.1 DATE GENERALE

Transcipţia este procesul de *copiere* a informaţiei genetice a unei gene, sub formă *codificată, complementară* şi *antiparalelă,* într-o molecula de ARN. Acest proces are loc în nucleu.

ARN este format din ribonucleotide, cu structura generală **[P-R-N]$_n$** , în care **P** = acid fosforic, **R** = riboza[12] iar **N** = baza azotată (**A**denina, **G**uanina, **C**itozina şi **U**racilul). Prin polimerizarea ribonucelotidelor (în sensul 5'→3') rezultă o monocatenă, de obicei scurtă. Se deosebesc mai multe tipuri de ARN, cu funcţii diferite: ARNm sau mesager este codant deoarece prin translaţie va determina sinteza unui polipeptid; ARNr sau ribosomal (mai multe tipuri) va participa la formarea ribosomilor, iar ARNt sau de transfer intervine direct în transportul aminoacizilor la ribosomi; alte tipuri sunt ARNsn şi ARNsno

[10] În realitate fluxul informaţional nu este exclusiv unidirecţional şi universal: unele secvenţe de ADN (retrotransposoni) sunt transcrise în ARN şi apoi sub acţiunea unei *transcriptaze* inverse sunt retrocopiate şi integrate aleatoriu în ADN; prin acelaşi mecanism unele retrovirusuri (de ex., HIV) care au ca material genetic ARN se pot insera în ADN-ul celulelor eucariote prin retrotranscripţie.

[11] Există trei tipuri de ARN polimeraza: I - pentru ARNr; II -pentru pre-ARNm; III - pentru ARNt.

[12] Riboza este *"oza"* (glucidul) descoperit la "**R**ockefeller **I**nstitut of **B**iochemistry" din New York.

(ce intervin în procesarea intronilor sau a ARNr). In cele ce urmează vom discuta mai ales transcripţia ARNm realizată de ARN polimeraza II ADN dependentă.

Pentru a se sintetiza *in vivo* un ARNm sunt necesare: *ADN ca model sau matriţă,* enzima *ARN polimerază II, factori de transcripţie* necesari pentru ghidarea şi activarea ARN polimerazei şi *ribonucleotide* activate. *Numai una din cele două catene ale ADN (3'→5') este transcrisă şi serveşte ca "matriţă"* pentru sinteza unei molecule complementare şi antiparalele (5'→3') de ARNm; dar aceasta nu este, la diferite gene, aceiaşi catenă care este copiată în lungul moleculei ADN, la diferite gene **(**figura 4.13**)**. Alegerea catenei transcrise depinde în mare parte de localizarea şi orientarea *promotorului,* locul unde se fixează prin intermediul factorilor de transcripţie, ARN polimeraza.

Cele două catene ale ADN-ului, catena transcrisă (3'→5') şi catena "de referinţă" (5'→3'), au o "nomenclatură" diferită. ARNm, care se formează prin transcripţie, va avea *aceeaşi secvenţă* de nucleotide (exceptând înlocuirea T cu U) şi *acelaşi sens* (5'→3') ca şi catena ADN *netranscrisă* motiv pentru care aceasta se numeşte **catenă sens** iar catena transcrisă este numită adesea **antisens**[13]**.** Raportul dintre secvenţa şi polaritatea ARNm pe de o parte şi cele două catene ale ADN pe de altă parte, precum şi unii termeni prin care se definesc aceste catene sunt prezentaţi mai jos:

5'...ATGTTACGACGT... 3' catena ADN "sens" (netranscrisă, de referinţă)
3'...TACAATGCTGCA... 5' catena ADN "antisens" (transcrisă)
|
Transcripţie
↓
5'...AUGUUACGACGU... 3' ARNm

Înainte de a descrie procesul de transcripţie este necesar să precizăm un element important. *ADN este identic în toate celulele somatice* (rezultate prin mitoze succesive din celula zigot); *diferenţierea* lor structurală şi funcţională implică expresia anumitor gene specifice de ţesut, care funcţionează împreună cu genele constitutive (*"domestice sau menajere"* de la *"housekeeping genes"* deoarece sunt active în toate celulele) ce controlează metabolismul celular (vezi capitolul 3.B.3). De aceea, expresia genelor specific tisulare implică **activarea selectivă** a acestor gene (prin intervenţia unor molecule specific tisulare), **recunoaşterea** lor de către ARN polimerază şi **modularea expresiei lor** ca moment, cantitate şi ritm. Fără a intra în detalii, vom preciza că aceste procese se realizează prin:

(1) realizarea unei *configuraţii "deschise" active a cromatinei* în anumite teritorii prin relaxarea structurii sale (*"decondensare"*) şi acetilarea histonelor nucleosomale (vezi capitolul 2.D.2.3);

(2) intervenţia secvenţelor sau *elementelor cis-reglatoare* din regiunea 5' situată în amonte de zona centrală, transcrisă, a genei: promotorul (cu *casetele* TATA sau GC şi CAAT) reprezintă semnalul de start al transcripţiei, ce stabileşte *localizarea şi direcţia* de acţiune a ARN polimerazei; secvenţele specifice de ţesut; activatorii etc (vezi structura genei, capitolul 3.B.1.2). Toate aceste elemente sunt ţinta unor *proteine trans-reglatoare* numite generic **factori de transcripţie** (TF); fixarea lor este determinantă atât pentru demarajul transcripţiei cât şi pentru intensitatea ei. *Fiecare genă posedă o combinaţie particulară de elemente cis-reglatoare* (figura 4.14).

Procesul de transcripţie la eucariote se desfăsoară în două mari etape, determinate de structura "discontinuă" ("fragmentată") a genelor eucariote. Acestea sunt:

- *formarea ARN mesager precursor* (pre-ARNm) sau transcriptul primar[14], prin transcripţia integrală a genei (exoni şi introni);
- *maturarea pre-ARNm,* printr-o serie de modificări din care rezultă ARNm matur, ce va trece în citoplasmă.

---

[13] Referirile la structura genei se fac întotdeauna la catena sens (de ex., *secvenţele reglatoare de la capătul 5' al genei* se referă la secvenţele situate la capătul 5' al catenei *sens* şi nu al catenei transcrisă, unde de fapt ele există şi acţionează !!!).

[14]Moleculele de transcript primar au fost denumite iniţial *ARN nuclear heterogen (hnARN).*

1.2. FORMAREA ARNm PRECURSOR

Formarea pre-ARNm începe prin *decondensarea* zonei din ADN care conţine gena sau genele ce vor fi transcrise. Acest proces implică intervenţia unor **factori de transcripţie de clasă I** (TF I), modificarea chimică a histonelor (acetilare, deplasarea H1 etc) care *va reduce gradul de compactare* a filamentelor cu nucleosomi şi deplasarea (printr-un mecanism încă necunoscut) a nucleosomilor din zona de ADN transcrisă într-un anumit moment.

Formarea pre-ARNm se realizează în trei etape.

(1) *Iniţierea transcripţiei.* Prin convenţie primul nucleotid din ADN cu care se începe transcripţia reprezintă "situsul de iniţiere al transcripţiei" (SIT sau INR)[15] şi este numit +1 iar nucleotidul care îl precede -1. Primul "pas" al transcripţiei este fixarea **ARN polimerazei** în regiunea **promotor,** situată spre capătul 5' al genei, în amonte de S.I.T. În această regiune, de circa 100 pb, se găsesc secvenţe nucleotidice speciale, identice la majoritatea genelor (secvenţe "consensus"), numite TATA box, CCAAT box şi GC box. Trebuie spus foarte clar că *ARN polimeraza nu poate recunoaşte direct promotorul şi nici nu poate iniţia singură transcripţia*. Pentru aceasta sunt necesari o serie de **factori de transcripţie** (TF II sau de clasă II) care se fixează pe secvenţele promotorului pentru *a ghida şi activa ARN polimeraza*. Enzima şi factorii de transcripţie formează un **complex multiproteic de iniţializare[16].** ARN polimeraza este poziţionată şi activată pentru a începe transcripţia la SIT, cu nucleotidul +1.

(2) *Transcripţia propriuzisă (elongaţia).* După fixarea ARN polimerazei, cele două catene ale ADN sunt separate (prin acţiunea TF IIF, cu acţiune de helicază), eliberându-se *catena transcrisă 3'→5'*, care serveşte drept **matriţă** (tipar) pentru aşezarea *secvenţială şi complementară* a ribonucleotidelor activate; ele vor fi apoi polimerizate de către ARN polimerază[17], formându-se ARNm; *Transcripţia se face numai în sensul 5'→3'* (deci ARNm este *antiparalel* faţă de catena transcrisă), fapt ce asigură marea *fidelitate a "citirii" informaţiei genetice*. ARNm se desprinde treptat de pe catena transcrisă (rămânâd fixat temporar numai la capătul 3'), iar cele două catene ale ADN se reunesc treptat, sub acţiunea unei topoisomeraze, şi refac dublul helix. Trebuie subliniat un fapt important: în molecula de ARNm precursor care se formează - numită şi transcriptul primar[18] - *sunt copiaţi atât exonii cât şi intronii.*

(3) *Terminarea transcripţiei* se face când ARN polimeraza întâlneşte *situsul de terminare a transcripţiei;* aici se află secvenţa AATAAA (citită pe catena netranscrisă) care semnalează clivarea 3' a transcriptului primar"; ea va corespunde în preARNm secvenţei AAUAAA.. Secţionarea ARNm sintetizat are loc (sub acţiunea unei nucleaze) la 15-30 nucleotide în aval de secvenţa AAUAAA din ARN, în dreptul "**situsului de poliadenilare".**

Transcripţia unei gene poate fi realizată de mai multe molecule de ARN polimerază, formându-se mai multe copii de ARNm ce conţin aceeaşi informaţie genetică (această *"amplificare"* va creşte considerabil în cursul translaţiei şi astfel o genă va determina mii de molecule proteice identice).

1.3. MATURAREA ARNm PRECURSOR

Maturarea nucleară a pre-ARNm cuprinde două procese distincte, destinate să facă ARNm mai "disponibil şi mai util" translaţiei (figura 4.15).

---

[15]Orice abatere de la "SIT" va determina sinteza unui mesager diferit de cel normal.

[16] TF IID se fixează pe secvenţa TATA iar TF IIB şi E fixează ARN polimeraza; complexul este stabilizat de TF IIA; la aceştia se adaugă TF IIF, cu activitate de *helicază,* care desface cele două catene ale ADN.

[17]ARN polimeraza se deplasează ca "un cursor pe un fermoar"

[18]Moleculele de pre-m ARN sunt cunoscute şi sub numele de "ARN heterogen' (hnARN).

a. Modificarea extremităţilor ARNm determină creşterea *stabilităţii* sale (protecţie la degradarea de către endonucleaze) si facilitează *transportul* în citoplasmă, *recunoaşterea* şi *fixarea* sa la subunitatea 40S ribosomală.

- La *capătul 5'* se adaugă, la primul nucleotid al transcriptului primar, o moleculă de 7-metil-guanozină, ce formează o structură specială, numită în l. engleză *"cap" (bonetă)*;
- La *extremitatea 3'* se adaugă[19] o serie de 50-200 de nucleotide cu adenină, formând o *"coadă" poliadenilică*. Această operaţie de poliadenilare este caracteristică ARNm (există o singură excepţie: ARNm pentru histone nu este poliadenilat).

b. Procesarea ARN precursor. Aşa cum am precizat, transcriptul primar ARN conţine secvenţe complementare cu întreaga regiune transcrisă din genă (zona centrală sau *cadrul de lectură*) ce conţine exoni (regiuni *exprimate*, codante) şi introni (regiuni *intercalare*, necodante). După sinteză, transcriptul ARN primar suferă o procesare complexă ce constă în *decuparea* precisă şi eliminarea ARN intronic urmată de *reunirea/legarea* "cap la cap" a ARN exonic, care va forma **ARNm matur**, alcătuit dintr-o serie continuă şi contiguă de exoni (cineva spunea foarte plastic că în această operaţie *"se separă grâul de neghină").* Aceste fenomene sunt denumite *"splicing"* în limba engleză, *"epissage"* în limba franceză; termenii corespund cuvântului românesc *"matisare"*, termen tehnic care se referă la *"înădirea a doua capete". Excizia şi reunirea* sunt operaţii foarte delicate care trebuie să fie deosebit de *precise*: o eroare de decupare cu un singur nucleotid modifică "cadrul de lectură" şi, după translaţie, va produce o proteină anormală.

Procesul este dependent de existenţa unor secvenţe nucleotidice-semnal situate la graniţa exoni-introni: **5'GT**(GU în ARN) sau *situs donor* şi 3'**AG** sau *situs acceptor*; o altă secvenţă importantă este *"branch site" (*ce poate fi tradus ca *situs de branşare, de legătură*), ce conţine nucleotidul **A**, situat foarte aproape de capătul 3' al intronului. Mecanismul de decupare (figura 4.16) se derulează în trei etape: (1) secţionare la joncţiunea 5'GU; (2) ataşarea nucleotidului terminal G la nucleotidul A al situsului de branşare şi formarea unei lasou/buclă; (3) secţionarea intronului la joncţiunea 3'AG, îndepărtarea lui şi unirea segmentelor de ARN exonic. Reacţiile sunt mediate de un complex ARN-proteine (*"spliceosome"*) ce cuprinde cinci tipuri dr ARNsn (*"small nuclear"*), numite U1-U6, dotate cu activitate enzimatică (*ribozime*) şi peste 50 de proteine

Ordinea exonilor în ADN şi transcriptul primar este păstrată în ARNm matur. Dar există o anumită flexibilitate în utilizarea exonilor, în sensul că (sub acţiunea unor factori încă necunoscuţi) în celule diferite, vor fi "reţinuţi" în ARNm matur numai o parte din exoni, alţii putând fi îndepărtaţi o dată cu intronii. Acest proces denumit *matisarea alternativă* a exonilor (figura 4.9) explică producerea în ţesuturi diferite a unor mesageri şi deci a unor proteine diferite (asemănătoare dar nu identice) pe baza informaţiei unei singure gene **(**vezi capitolul 4.B.4).

2. TRANSLAŢIA

A doua etapă a expresiei genice este **translaţia[20] -** procesul de *decodificare* a informaţiei genetice din mARN care permite *aranjarea secvenţială specifică* a amino acizilor şi polimerizarea lor într-o catenă polipeptidică.

Procesul de translaţie necesită, firesc, "un dicţionar" reprezentat de codul genetic şi un aparat de translaţie care trebuie să includă, printre alte componente, şi "traducătorul", reprezentat de moleculele de ARN de transfer (ARNt).

---

[19]Prin acţiunea unei poli-A polimeraze

[20]Denumirea de *translaţie* semnifică *traducerea* informaţiei scrisă în "limbajul" nucleotidelor în ARNm în "limbajul" de aminoacizi al peptidelor.

2.1. CODUL GENETIC.

Informaţia din structura unei gene este "scrisă" sub forma unei *anumite secvenţe* a celor patru tipuri de nucleotide: A,G,T,C. Ea este copiată (transcrisă) complementar (U,C,A,G) în ARNm şi apoi "tradusă" într-o anumită secvenţă de aminoacizi, care vor forma o catenă polipeptidică; această *translaţie* se face cu ajutorul unui fel de "dicţionar bilingv" care este codul genetic.

Codul genetic reprezintă *"un sistem de corespondenţe"* între o anumită secvenţă de trei nucleotide numită **codon** şi un anumit aminoacid **(**tabelul 4.2**).** Cu cele patru *"litere"ale alfabetului genetic"* se pot scrie *"cuvinte"* alcătuite din trei litere; gena ar fi deci *"o frază"* formată dintr-o înşiruire de codoni, ce determină o anumită secvenţă a aminoacizilor într-un polipeptid. Descifrarea[21] codului genetic (1965) a fost o descoperire extraordinară, *"mai fantastică decât descifrarea hieroglifelor",* deoarece a marcat decisiv debutul erei biologiei moleculare; de aceea Khorana şi Nirenberg au primit premiul Nobel (1968).

Tabelul 4.2 Codul genetic

Prima bază	A doua bază								A treia bază
	U		C		A		G		
U	UUU	phe	UCU	ser	UAU	tyr	UGU	cys	U
	UUC	phe	UCC	ser	UAC	tyr	UGC	cys	C
	UUA	leu	UCA	ser	UAA	**stop**	UGA*	**stop**	A
	UUG	leu	UCG	ser	CAU	**stop**	UGG	trp	G
C	CUU	leu	CCU	pro	CAG	his	CGU	arg	U
	CUG	leu	CCC	pro	CAA	his	CGC	arg	C
	CUA	leu	CCA	pro	CAG	gln	CGA	arg	A
	CUG	leu	CCG	pro	CAG	gln	CGG	arg	G
A	AUU	ile	ACU	thr	AAU	asn	AGU	ser	U
	AUC	ile	ACC	thr	AAC	asn	AGC	ser	C
	AUA	ile	ACA	thr	AAA	lys	AGA	arg	A
	AUG	met	ACG	thr	AAG	lys	AGG	arg	G
G	GUU	val	GCU	ala	GAU	asp	GGU	gly	U
	GUC	val	GCC	ala	GAC	asp	GGC	gly	C
	GUA	val	GCA	ala	GAA	glu	GGA	gly	A
	GUG	val	GCG	ala	GAG	glu	GGG	gly	G

Abrevieri pentru aminoacizi

ala (A) - alanina	gly (G) - glicina	pro (P) - prolina
arg (R) - arginina	his (H) - histidina	ser (S) - serina
asn (N) - asparagina	ile (I) - isoleucina	thr (T) - treonina
asp (D) - acidul aspartic	leu (L) - leucina	trp (W) - triptofanul
cys (C) - cisteina	lys (K) - lizina	tyr (Y) - tirozina
gln (Q) - glutamina	met (M) - metionina	val (V) - valina
glu (E) - acidul glutamic	phe (F) - fenilalanina	X - stop

* în anumite condiţii UGA poate specifica *selenocisteina* ("al 21-lea aminoacid)

Fără a intra în detalii vom menţiona succint proprietăţile codului genetic.

(1). *Codul genetic este triplet* pentru motivul logic că 3 este prima putere a lui 4 (cele patru tipuri de nucleotide) care formează 64 de combinaţii, suficiente pentru cei 20 de amino acizi care se găsesc în structura proteinelor.

[21]Codul genetic a fost descifrat experimental folosind drept ARNm polinucelotide sintetice cu o secvenţă cunoscută şi analizând secvenţa de aminoacizi a proteinei sintetizate artificial. De exemplu, ARNm sintetic poliuracil a produs un polipeptid alcătuit exclusiv din fenilalanină; astfel s-a stabilit că tripletul UUU codifică fenilalanină.

(2). *Codul genetic are un codon iniţiator (AUG) şi trei codoni stop* (UAA, UAG, UGA), veritabile semne de punctuaţie cu care se începe şi se termină sinteza polipeptidului. Codonii stop sunt numiţi şi *"codoni nonsens"* deoarece nu semnifică nici un aminoacid. Ceilalţi 61 de codoni sunt *"codoni sens"* ce semnifică 20 de amino acizi (tabelul 4.1).

(3). *Codul genetic este degenerat (redundant)* deoarece mai mulţi codoni semnifică un acelaşi amino acid (de aceea ei se numesc *"codoni sinonimi"*). Exceptând metionina şi triptofanul, codificaţi de un singur codon, ceilalţi 18 amino acizi sunt codificaţi de 2-6 codoni (deseori deosebiţi prin al treilea nucleotid). Degenerescenţa nu s-a stabilit la întâmplare deoarece aminoacizii cei mai reprezentaţi în proteine sunt cei care posedă cei mai mulţi codoni. Cu toată conotaţia sa peiorativă, *caracterul degenerat al codului genetic este un avantaj* pentru celulă deoarece unele mutaţii genice ce produc codoni sinonimi nu modifică proteina codificată de genă (mutaţii *silenţioase* sau *iso-semantice).* Se poate afirma că degenerescenţa codului genetic este un veritabil *sistem de protecţie contra efectelor mutaţiilor*.

(4). *Codul genetic este nesuperpozabil* (deoarece codonii vecini nu au un nucleotid comun) *şi fără virgule* (întrucât codonii sunt adiacenţi, neseparaţi printr-un nucleotid cu rol de "virgulă"); codonii sunt definiţi prin *simpla grupare de câte trei*[22]. Dacă, printr-o mutaţie, într-unul dintre codon se suprimă (deleţie) sau se inseră (adiţie) 1-2 nucleotide (sau un alt număr care nu este un multiplu de trei) se produce *o decalare a cadrului de lectură al genei*, rezultând (printr-o nouă grupare câte trei, alţi codoni; în proteina sintetizată se modifică *toţi* aminoacizii începând cu locul în care s-a produs mutaţia (numită *"frame-shift"*).

(5). *Codul genetic este lipsit de ambiguitate* întrucât un codon semnifică întotdeauna un anumit aminoacid, totdeauna acelaşi.

(6). *Codul genetic este universal* , acelaşi la toate organismele, bacterie, plantă, animal sau om. Totuşi codul genetic mitocondrial are câteva mici diferenţe faţă de cel nuclear (codoni cu sensuri diferite); unele au fost găsite şi la levuri, paramecii şi la unele arheobacterii. Cu toate aceste foarte mici excepţii caracterul universal al codului genetic este evident. Acest lucru este foarte important în "ingineria genetică" deoarece bacteriile recombinante, în care s-a introdus o genă umană, fabrică proteina umană folosind codul genetic bacterian care, în fond, este acelaşi ca şi la om.

Înainte de a încheia, vom sublinia importanţa cunoaşterii codului genetic şi pentru înţelegerea mecanismului şi consecinţelor unor mutaţii genice (punctiforme) ce produc înlocuirea sau inserţia/adiţia unui nucleotid (tabelul 4.3) (vezi capitolul 6.B.2).

Tabelul 4.3. Consecinţele unor mutaţii genice prin substituţia, inserţia sau adiţia unui nucleotid într-un codon

<table>
<tr><td colspan="3">Substituţia unui nucleotid
AUG UGU AAA CCA
Met cis lys pro</td></tr>
<tr><td>Mutaţie silenţioasă

AUG UG<u>C</u> AAA CCA
Met cis lys pro</td><td>Mutaţie missens
(cu sens greşit)
AUG UG<u>G</u> AAA CCA
Met trp lys pro</td><td>Mutaţie nonsens

AUG UG<u>A</u> AAA CCA
Met Stop</td></tr>
<tr><td colspan="3">Inserţia sau deleţia unui nucleotid
AUG UUU AAA GUU UCG
Met – Phe – Lys –Val – Ser</td></tr>
<tr><td colspan="3">Mutaţii frameshift
(mutaţii cu decalarea cadrului)</td></tr>
</table>

[22]Orice deleţie sau adiţie a unui nucleotid va schimba "cadrul de lectură al genei" deci practic toţi codonii (formaţi prin gruparea câte trei) ce urmează după locul deleţiei/adiţiei nucleotidice.

AUG UUU **G**AA AGU UUC G	AUG UUU AA-G UUU CGA
Met–Phe – Glu – Ser – Phe	Met – Phe – Lys – Leu– Arg

2.2. APARATUL DE TRANSLAŢIE.

Aparatul de translaţie este alcătuit din numeroase componente: ARNm, ribosomii, ARNt, aminoacizi, factori de iniţiere, factori de elongaţie, enzime, surse de energie etc. În sinteză, ARNm furnizează informaţia (secvenţa de codoni) care va fi translată într-o secvenţă de amino acizi în proteină; el se fixează pe ribosom (o particulă alcătuită din ARNr şi proteine) şi care reprezintă platforma de sinteză a polipeptidului. ARNt fixează un aminoacid specific şi apoi amplasează acest aminoacid în polipeptid, folosind informaţia din ARNm

a). Ribosomii sunt organite citoplasmatice (descrise de George Emil Palade, premiul Nobel, în 1974), veritabile *"platforme de asamblare a aminoacizilor în proteine"* pe baza instrucţiunilor ARNm. Ribosomii eucariotelor sunt alcătuiţi din două subunităţi inegale, [deosebite prin constanta de sedimentare (S): 40S şi 60S], care sunt de obicei disociate şi libere în citoplasmă; ele *se reunesc* la începutul translaţiei pentru a forma *ribosomul activ*. Fiecare subunitate este alcătuită din **ARN ribosomal** şi proteine[23], care au rol structural şi funcţional/catalitic (facilitează: fixarea moleculelor de ARNm şi ARNt la ribosom; deplasarea ribosomului, ş.a.). Ribosomii prezintă patru *situsuri funcţionale*: pe subunitatea mică se află situsul de fixare al extremităţii 5' a ARNm iar pe subunitatea mare: situsul P (*peptidil*) şi A (*aminoacil*) unde se fixează moleculele de ARNt cuplate cu aminoacizii lor specifici, precum şi situsul de fixare al peptidil-transferazei, enzima ce polimerizează aminoacizii într-un polipeptid. În procesul de translaţie, ribosomii *se deplasează* în lungul moleculei de ARNm, spre capătul 3'. Pe măsura deplasării, alţi ribosomi pot începe translaţia aceleiaşi molecule de ARNm, alcătuind împreună un **poliribosom**.

b). ARN de transfer (ARNt) *transportă* aminoacizii din citoplasmă la ribosomi, locul sintezei proteice. Aici ARNt *recunoaşte* codonul din ARNm corespunzător aminoacidului respectiv, pe care îl poziţionează în dreptul acestui codon; deci ARNt are rolul de *"translator"*.

ARNt este un micropolimer de ribonucleotide (75-100 nucleotide), monocatenar, cu o structură secundară şi terţiară "în treflă" (figura 4.17) , relativ identică la toate tipurile de ARNt. El posedă două situsuri importante**)**:

- extremitatea 3'OH este terminată prin *nucleotidele CCA*, iar la poziţia 3' a ribozei adeninei se fixează aminoacidul transportat, cu ajutorul unei enzime *aminoacil-ARNt-sintetaza*;
- *anticodonul*, un grup de trei nucleotide situat în bucla opusă extremităţii 3'OH; el recunoaşte, prin complementaritate, codonul din ARNm corespunzător aminoacidului[24].

c). Enzimele şi cofactorii proteici ai translaţiei sunt, deasemeeai elemente importante. În procesul de translaţie sunt implicate amino-acil-ARNt-sintetazele şi peptidil-transferaza. **Aminoacil-ARNt-sintetazele** sunt 20 de enzime cu o dublă specificitate: recunosc fiecare un anumit aminoacid (foarte probabil pe baza configuraţiei sale spaţiale) precum şi ARNt corespunzător. În acest proces de "încărcare", mecanismul de recunoaştere între o anumită enzimă şi ARNt specific a fost recent descifrat: enzima recunoaşte specific fie

---

[23]La eucariote subunitatea mică are un tip de ARNr (18S) şi 33 proteine ribosomale iar cea mare trei tipuri de ARNr (5S, 5,8S, 28S) şi 45 proteine ribosomale. Moleculele de ARNr sunt codificate de gene prezente în mii de copii pe braţele scurte ale cromosomilor acrocentrici, care formează "regiunile organizatoare de nucleoli".
Structura ARNr şi a proteinelor ribosomilor la procariote este diferită de cea de la eucariote şi acest lucru are o importanţă deosebită deoarece unele amtibiotice (de ex., streptomicina) care acţionează la nivelul ribosomilor sunt active la bacterii şi fără efect asupra ribosomilor şi sintezei proteice la om.

[24]Teoretic ar trebui să existe în celulă 61 de molecule diferite de ARNt pentru cei 61 de codoni sens. In realitate numărul lor este mai mic (~40) dar superior celor 20 de aminoacizi; deci un acelaşi tip de aminoacid va fi purtat de mai mulţi ARNt specifici (iso-acceptori), diferiţi prin anticodonul lor prin al treilea nucleotid; această flexibilitate este denumită în limba engleză *"wobble"* (a şovăi).

anticodonul unor molecule de ARNt fie o pereche de nucleotide (de exemplu, UG pentru E+alanină) situate spre extremităţile terminale 5' şi 3' ale ARNt (figura 4.17); ele formează un veritabil *al doilea cod genetic*. **Peptidil-transferaza** catalizează formarea legăturii peptidice între doi aminoacizi.

Cofactorii proteici intervin în diferite etape ale translaţiei. Ei sunt reprezentaţi de *factorii de iniţiere* (IF 1-6), factorii de elongaţie (EF 1-2) şi un factor de terminare (RF). Inactivarea lor (prin diferite toxine microbiene) blochează procesul de translaţie şi produce moartea celulară.

2.3. PROCESUL DE TRANSLAŢIE**.**

Translaţia se realizează în trei etape succesive: iniţierea, elongaţia şi terminarea translaţiei **(**figura 4.18**)**; fiecare etapă implică molecule diferite şi necesită energie (furnizată de ATP sau GTP).

Iniţierea translaţiei este o etapă complexă care, în esenţă, va plasa primul aminoacid (AA) al proteinei (de la extremitatea sa NH_2-terminală) în dreptul codonului iniţiator AUG din ARNm, ce corespunde metioninei, şi va asambla în această poziţie cele două subunităţi ce vor forma ribosomul activ.

Într-un prim timp, ARNm se fixează (cu *Cap* şi secvenţa 5'.CCACC**AUG**C-3') pe subunitatea mică a ribosomului[25]; apoi, se formează un *complex de iniţiere* între ARNm, ARNt-1 "Încărcat" cu AA-1 (metionină) şi diferiţi factori de iniţiere ai translaţiei (IF2, IF3) cu rol catalizator; anticodonul ARNt-iniţiator este în contact cu codonul AUG al ARNm**.** Apoi, prin acţiunea unui alt IF, se fixează subunitatea mare 60S şi ribosomul devine *activ,* deci capabil de a participa la sinteza polipeptidică. ARNt-iniţiator se va palsa direct în situsul P al subunităţii mari a ribosomului **(**figura 4.18**).**

Elongaţia este o etapă relativ simplă şi repetată succesiv în cursul cărie se formează legături peptidice între AA aşezaţi secvenţial pe baza ordinii codonilor din ARNm.

După plasarea ARNt1 în poziţia P a ribosomului în situsul A (amino-acil) liber vine şi se plasează ARNt-2 încărcat[26] cu AA-2, codificat de al doilea codon din ARNm. In acest momen, sub acţiunea enzimei **peptidil-transferaza** se realizează *legătura peptidică* între primii doi aminoacizi, formându-se un dipeptid (legat la ARNt2). După formarea dipeptidului, sub influenţa factorului de elongaţie EF2, GTP şi a unei *translocaze*, ribosomul se deplasează cu trei nucleotide în lungul ARNm, în direcţia 5'→3'. Astfel ARNt-1 este scos din situsul P care va fi ocupat de ARNt-2, care poartă dipeptidul[27]. În situsul A eliberat se fixează ARNt-3 cu AA-3 şi, printr-o nouă legătură peptidică, AA-3 este fixat la la dipeptid.

Ciclul celor trei faze (acroşarea AA~ARNt la ribosom, formarea legăturii peptidice, translocarea ribosomului) se repetă şi astfel catena polipeptidică creşte la fiecare ciclu cu un amino acid. De subliniat că pe măsură ce un ribosom avansează în lungul catenei de mARN alţi ribosomi[28] pot începe "lectura" acestei catene formându-se astfel sute sau mii de molecule proteice identice (*"amplificare"*). Desigur în procesul de sinteză a polipeptidului se pot produce erori dar ele sunt corectate prin diferite mecanisme, ce implică diferite enzime şi factori de elongaţie.

Terminarea. Elongaţia polipeptidului **se opreşte** când ribosomul ajunge la un codon stop, situsul de terminare a translaţiei. Î

---

[25]Asociere ARNm la această subunitate şi potrivirea exactă a codonului AUG se face printr-o secvenţă purinică specială, situată chiar înaintea codonului iniţiator şi complementară unei secvenţe pirimidinice din ARNr subunităţii mici. Un rol cert dar încă neclar are şi structura *"cap"* de la extremitatea 5' a ribosomului

[26]Fixarea este favorizată de un factor de elongaţie, EF1.

[27]Trecerea ARNt din situsul P în A se numeşte *translocaţie.*

[28]Ribosomii fixaţi la aceeaşi moleculă de ARNm formează *"un polisom"* (sau poliribosom).

n acest moment se produce dezasamblarea complexului ribosom-ARNm-polipeptid (prin intervenţia unui factor proteic, RF) şi polipeptidul este eliberat din ribosom. Ribosomul poate fi reciclat pentru o nouă sinteză iar polipeptidul suferă o serie de modificări posttranslaţionale şi capătă forma tridimensională specifică

3. LOCALIZAREA PROTEINELOR

Fiecare proteină, sintetizată pe baza informaţiilor unei gene, funcţionează într-un anumit compartiment celular; de ex., tubulina-în citosol; histonele-în nucleu; succinat coenzima A reductaza-în mitocondrii; glicozil-transferazele-în aparatul Golgi; receptorii hormonilor peptidici-pe membrana celulară; colagenul-în spaţiul extracelular etc. Orice proteină cu o localizare specială posedă în structura ei una sau mai multe "secvenţe-semnal" care vor determina, ca un veritabil "cod poştal", adresa sa de destinaţie.

O primă sortare a polipeptidelor nou sintetizate separă proteinele care vor ramâne în interiorul celulei de cele care vor fi "exportate"/excretate la exteriorul celulei. Această decizie iniţială este determinată de prezenţa unei secvenţe de 15-30 aminoacizi (hidrofobi), situată la capătul N terminal al proteinelor care vor fi excretate; ea se numeşte **peptid signal** (semnal peptidic) şi lipseşte la proteinele cu destinaţie intracitoplasmatică. După ce s-au încorporat circa 70 de AA dintr-o proteină excretată, secvenţa semnal devine "vizibilă" din canalul ribosomic şi pe ea se fixează o particulă numită SRP (*Signal Recognition Particule)*[29], care opreşte translaţia. Complexul *SRP-semnal peptidic* recunoaşte şi se fixează pe un receptor (*"docking protein"*) situat pe suprafaţa citosolică a reticulului endoplasmic (RE) (figura 4.19). După fixare, semnalul peptidic traversează membrana RE iar ribosomii ce efectuează translaţia se fixează la RE; apoi particula SRP este eliberată şi translaţia se reia dar polipeptidul sintetizat este dirijat în lumenul RE (unde secvenţa peptidică care "şi-a făcut datoria" a fost deja clivată), fiind apoi transportat la exteriorul celulei.

Printr-un mecanism asemănător se realizează transportul proteinelor nucleare sau mitocondriale sau celor destinate aparatului Golgi. În cazul proteinelor lizozomale şi membranare mecanismele sunt diferite. Proteinele (proteazele) destinate lizozomilor au o secvenţă de aminoacizi care determină adiţia posttranslaţională a *manozei-6-fosfat*; această modificare determină dirijarea acestor glicoproteine din RE sau aparatul Golgi în interiorul lizozomilor. Dacă accidental modificare nu se produce transportul proteazele lizozomale neprocesate va fi anormal (în mucolipidoze şi boala celulei I). Proteinele ataşate la membrană se fixează prin secvenţe peptidice şi SRP la un receptor din vecinătatea unui por membranar; ele încep să traverseze membrana prin acest por până când se ajunge la o secvenţă ce opreşte transferul şi determină inserţia proteinei în pătura lipidică a mebranei.

4. MODIFICĂRILE POST-TRANSLAŢIONALE ALE PROTEINELOR.

Pe măsură ce un polipeptid se sintetizează, în anumite zone se formează prin repliere *structuri secundare* (α-elice în proteinele fibrilare sau β-pliere, în proteinele globulare) (figura 4.6) prin interacţiuni (punţi de hidrogen, punţi disulfidice) între diferiţi aminoacizi învecinaţi sau situaţi mai la distanţă; în felul acesta, la sfârşitul sintezei, polipeptidul ia configuraţia spaţială, tridimensională, specifică, care îi determină activitatea.

Structura tridimensională a proteinelor este rezultatul interactiunilor fizice care se stabilesc între aminoacizii constituienţi. Cu toate acestea s-a constatat că plicaturarea iniţială a moleculelor proteice este un proces mediat de o serie de proteine numite "*chaperones*" (Hsp60, Hsp70 si Hsp90). Ele se cuplează la nivelul lanţului polipeptidic nascent şi previn mai întâi iniţierea plicaturării extremităţii N-terminale până când întregul proces de translaţie nu este finalizat. De asemeni, proteinele chaperones au un rol important

[29] SRP este alcătuită din 6 proteine şi o mică moleculă de ARN 7SL,

în cazul proteinelor care trebuiesc transportate în diferite compartimente celulare, precum mitocondriile sau reticulul endoplasmatic, prevenind plicaturarea acestora până la atingerea destinaţiei.

În afara modificărilor conformaţionale, polipeptidele pot suferi şi alte modificări calitative, permanente sau reversibile care, în esenţă, fac ca o proteină să devină activă.

Modificările reversibile ale proteinelor sunt reprezentate în special de *acetilarea Lys* (în cazul histonelor) sau *fosforilarea Ser* (în cazul kinazelor); aceste modificări pot influenţa, uneori decisiv, activitatea proteinei.

Modificările permanente pot fi de asemenea numeroase şi importante.

- *Clivarea proteolitică a catenei peptidice.* După sinteza catenelor polipeptidice are loc cel mai adesea clivarea metioninei iniţiale şi, la unele proteine, a mai multor aciziaminaţi de la extremitatea NH_2 (secvenţa "peptid signal"). Numeroase proteine sunt sintetizate sub forma unui precursor *inactiv* (pro-hormon, proferment) care nu poate acţiona asupra substratului; după sinteză, precursorul este clivat proteolitic şi rezultă o proteină matură, activă funcţional. Un exemplu sugestiv este reprezentat de sinteza insulinei (figura 4.20). Alteori dintr-un singur precursor proteic(de exemplu., proopiomelanocortina) se pot produce mai multe polipeptide cu funcţie diferită
- *Hidroxilarea unor aminoacizi*, de exemplu prolina şi lizina în cazul colagenului, asigură stabilitatea unor complexe proteice (tripla elice de colagen).
- *Glicozilarea* este un proces întâlnit în cazul glicoproteinelor, care sunt de regula fie secretate, fie localizate la suprafata celulelor. Glicozilarea poate fi inţiată la nivelul RE (N-glicozilarea unei asparagine prin adăugarea unui oligozaharid comun alcătuit din 14 reziduuri glucidice care va fi procesat ulterior) sau în interiorul aparatului Golgi (O-glicozilarea unei serine prin ataşarea unui rest de N-acetilglucozamină sau a unei treonine).
- *Adăugarea de lipide* este caracteristică proteinelor care vor fi ancorate în membrana plasmatică. În cazul proteinelor care se vor localiza la faţa internă a membranei plasmatice pot fi întâlnite trei tipuri principale de adiţii lipidice: N-miristoilarea (la nivelul glicinei situate la extremitatea amino a proteinelor), prenilarea (la nivelul lanţurilor laterale ale aminoacizilor ramificaţi: cisteina, serina si treonina) şi palmitoilarea (la nivelul atomului de sulf al cisteinei). În cazul proteinelor care se localizează la faţa externă a membranei plasmatice sunt ataşate grupări glicolipidice, de regulă la capătul C-terminal al lanţului peptidic.

Proteinele pot fi compuse din unul sau mai multe polipeptide (formând o proteină multimerică; de exemplu, hemoglobina, fibrele de colagen etc), fiecare fiind supuse unor modificări posttranslaţionale. Astfel, ele pot intracţiona cu o serie de *cofactori specifici* (de exemplu, cationi bivalenţi Ca+2, Fe+2, Cu+2, Zn+2 sau molecule mici necesare activităţii enzimatice, cum ar fi NAD+) sau *liganzi*. Toate acestea vor influenţa puternic conformaţia şi deci activitatea proteinei.

5. SINTEZA PROTEINELOR , ORIGINEA ŞI EVOLUŢIA VIEŢII .

Originea acizilor nucleici şi a proteinelor, a codului genetic, a aparatului şi mecanismului de translaţie sunt probleme interesante şi actuale, deoarece ele reprezintă, în esenţă, substratul biochimic al originii vieţii. Faptele certe sunt puţine iar ipotezele numeroase şi divergente. Dogma centrală a geneticii: **ADN → ARN → proteine** implică existenţa unor molecule informaţionale dar şi a unor proteine catalitice care să realizeze diferitele etape ale transferului informaţiei genetice. Se pune firesc întrebarea: cine a apărut mai întâi pe Pământ, proteinele sau acizii nucleici; dacă se acordă prioritate acizilor nucleici atunci nimeni nu poate răspunde la întrebarea: cum a fost posibilă replicarea, transcripţia sau translaţia acizilor nucleici în absenţa unor proteine catalitice. Astfel, la nivel molecular, clasica dilemă "oul sau găina" se traduce printr-o nouă dilemă "acizii nucleici sau proteinele".

ADN nu poate fi "molecula originară" deoarece este lipsită de activităţi catalitice. Recent s-au descoperit însă **ribozimele**, molecule de ARN dotate cu activitate catalitică şi s-a presupus că ARN ar putea fi în acelaşi timp o moleculă informaţională şi enzimatică, putând să realizeze singură stocarea, conservarea şi expresia informaţiei ereditare. S-ar putea deci prezuma că viaţa a început "în supa prebiotică" prin formarea spontană a moleculelor de ARN, amino acizi şi polipeptide care, acţionând în simbioză, ar fi realizat complexe ribonucleoproteice capabile de "proliferare şi perenizare". Foarte probabil, ARN a apărut înaintea ADN. Caracterul chimio-reactiv al sistemului determină însă instabilitatea sa şi riscul de auto-distrugere. Pentru a evita acest lucru s-a trecut la o etapă superioară "acizi nucleici bicatenari", prin asocierea a două molecule complementare de ARN. Această structură mult mai complexă pierde activitatea enzimatică (preluată de alte molecule polipeptidice) dar asigură stabilitate precum şi perpetuarea informaţiei, prin replicare.

Caracterul universal al codului genetic permite ipoteza logică că toate organismele vii au avut un strămoş comun. El avea un cod genetic deja "elaborat", identic cu cel actual; în cursul evoluţiei acest cod genetic a rămas "îngheţat", nu a suferit modificări. Se poate concluziona că apariţia codului genetic şi a aparatului său traducător s-a făcut deci în etapa prebiotică. Acizii nucleici, primul "pas" al evoluţiei biologice, au apărut pe cale *abiogenă* şi apoi s-au specializat, unii jucând rol de matriţă, alţii pe cel de translatori. Astfel, acizii nucleici au dobândit capacitatea de a dirija asamblarea aminoacizilor (apăruţi prin acelaşi mecanism abiogen). Iniţial ei realizau acest proces ambiguu şi bidirecţional; ulterior, selecţia şi evoluţia au exclus ambiguitatea şi au stabilit un sens unidirecţional de lectură a informaţiei din ADN. Evident, în absenţa unor "molecule fosile", toate acestea rămân la nivel de ipoteze.

O problemă, corelată cu evoluţia iniţială a lumii vii, este absenţa intronilor la bacteriile actuale şi prezenţa lor la eucariote sau ...la bacteriile fosile de tip arheobacterii. Până nu de mult se considera că organismele eucariote provin dintr-o bacterie. Ori, această idee pare greşită: procariotele şi eucariotele actuale provin probabil dintr-un strămoş comun asemănător arheobacteriilor, care posedă un genom cu introni. Probabil că şi codul genetic avea mici diferenţe faţă de cel actual, fiind foarte asemănător cu cel al mitocondriilor. Evoluţia s-a făcut prin pierderea intronilor, totală la procariotele actuale parţială la eucariote[30]. Deci bacteriile actuale, lipsite de introni ar fi ...punctul maxim al evoluţiei (!!) deoarece utilizarea ADN este mai performantă decât la eucariote. Explicaţia s-ar putea baza pe timpul de înmulţire foarte scurt (minute) ce face posibilă succesiunea în timp a unui număr aproape infinit de generaţii, oricum mult mai mare ca al eucariotelor superioare. Această schemă seducătoare nu explică însă amplificarea taliei genomului odată cu "păşirea" pe treptele superioare ale evoluţiei eucariotelor.

O altă problemă vizează însăşi originea genelor actuale cu o structură "în mozaic". Compararea (cu ajutorul ordinatoarelor) a secvenţei de aminoacizi a diferitelor proteine relevă la unele proteine existenţa unor domenii comune cu ale altor proteine. Spre exemplu, în structura receptorilor pentru lipoproteinele LDL există un domeniu care se găseşte în structura proteinei C9 a complementului sau alte domenii care există în receptorul EGF (*epidermal growth factor)* în factorul IX a coagulării sau proteinei C. Deoarece fiecare domeniu este codificat de un anumit exon, se poate conchide că genele care determină proteinele respective au exoni comuni. Pentru a explica acest fenomen s-a presupus că "*...genele pentru proteinele actuale s-au format ca jocul de Lego*" adică, prin asamblarea unor exoni (ce ar putea fi nişte "gene mai mici") ce codifică anumite unităţi funcţionale, într-o structură mai complexă, deci o genă "mai mare" ce determină o proteină mai complexă, cu proprietăţi specifice; mai clar, aceeaşi exoni ar fi fost folosiţi în asamblarea unor gene

[30]Studiul genelor pentru actină la diferite organisme relevă diferenţe în numărul intronilor, care scade odată cu evoluţia.

diferite. Intronii prezenţi încă de la primele bacterii ancestrale ar fi, în această concepţie, "fragmente de gene nefuncţionale"

D. REGLAREA EXPRESIEI GENELOR.

Celulele corpului uman, indiferent de structura şi funcţia lor, posedă aceeaşi informaţie genetică, deoarece rezultă prin mitoze succesive din zigot. Expresia genică este însă diferită. Unele gene (constitutive / domestice, de la *housekeeping genes*) sunt exprimate continuu, în toate tipurile celulare, fiindcă produşii lor proteici sunt necesari permanent celulei (sinteze proteice, producere de energie etc); multe alte gene au o expresie limitată la anumite ţesuturi specifice iar altele sunt complet şi permanent inactivate. În plus, expresia genelor „autorizate" să se exprime prezintă o *limitare spaţială* (pentru anumite organe, ţesuturi, celule, componente celulare) şi *temporală* (stadii diferite ale dezvoltării, diferenţierii, ciclului celular), fiind adaptată la natura şi intensitatea stimulilor extracelulari (factori inductibili). Toate aceste fenomene presupun intervenţia unor mecanisme complexe de control a expresiei genice.

Mecanismele de reglare ale expresiei genelor au fost descifrate iniţial la procariote; ele se bazează pe celebrul "model al operonului" descris în 1961 de către Jacob şi Monod la E. coli. (Premiul Nobel, 1965).

> Operonii regrupează într-o singură unitate funcţională mai multe gene de structură (ce codifică enzime diferite care sunt însă implicate în acelaşi lanţ metabolic), precum şi gene de reglare a transcripţiei. Genele reglatoare produc prin intermediul unor substanţe (represori) inactivarea sau activarea genelor de structură, de obicei sub acţiunea unor factori de mediu (inductori, corepresori).

Mecanismele de reglaj genic descrise la procariote nu sunt însă decât parţial aplicabile la eucariote (reglarea inductibilă), şi deci la om, pentru două motive esenţiale: genomul uman nuclear este *enorm* (comparativ cu al bacteriilor) şi puternic *compactat* în fibrele de cromatină, în nucleu. Recunoaşterea şi activarea unei secvenţe scurte de nucleotide, corespunzătoare unei gene, într-un timp minim este foarte dificilă. De aceea în celulele diferenţiate, anumite gene sunt deja *preselecţionate*, prin modificarea dispoziţiei cromatinei.

La eucariote funcţionează în mod cert *mecanisme de reglaj multiple* ce acţionează în fiecare etapă (la niveluri diferite) a exprimării genelor sau "fluxului de informaţie" **ADN → ARNm→ proteine;** ele sunt adesea înlănţuite şi/sau arborescente, reducând considerabil efortul de *selecţie al unor gene* ce trebuie exprimate şi permiţând *o ajustare a vitezei şi intensităţii reacţiei* la diferiţi stimuli. Etapa principală a reglării expresiei genice se desfăşoară în toate celulele la nivelul iniţierii transcripţiei ADN (controlul transcripţional, ce vizează recrutarea, poziţionarea şi activarea ARNpolimerazei II). Dar mecanismele de control acţionează şi la celelalte niveluri, post-transcripţionale, în care este implicat ARNm (procesarea preARNm, transportul şi stabilitatea ARNm, translaţia, procesarea proteinelor).

Mecanismul molecular comun pentru majoritatea formelor de reglare a expresiei genice este reprezentat de fixarea şi interacţiunea unor factori proteici la secvenţele de reglare ale acizilor nucleici, situate în vecinătatea genei (pe ADN) sau pe ARN transcris. Factorii proteici reglatori sunt codificaţi de gene situate la distanţă; deoarece ei trebuie să "migreze" la situsul de acţiune sunt numiţi generic **factori trans-reglatori** (sau trans-activi). Secvenţele de reglare la care se fixează aceşti factori se găsesc în aceiaşi regiune ADN sau moleculă de ARN ca şi gena sau transcriptul ARN ce trebuie reglat; de aceea aceste secvenţe se numesc generic **elemente cis-reglatoare** (sau cis-active). In afară de factorii genetici, controlul expresiei genice poate fi influenţat si de factori negenetici (care nu interesează secvenţa de nucleotide a ADN), cu alte cuvinte informaţia genetică ramâne nemodificată şi, de aceea, au fost denumite **modificari epigenetice** (*epi* – peste).

1. REGLAREA PRETRANSCRIPTIONALĂ (EPIGENETICĂ) A EXPRESIEIE GENICE

Reglarea pretranscripţională a expresiei genice vizează manifestarea lor "spaţială" în anumite organe, ţesuturi, linii sau tipuri celulare şi chiar celule individuale. După cum se ştie, conţinutul în ADN al tuturor celulelor umane nucleate (provenite prim mitoze succesive din zigot) este virtual identic dar, exceptând genele "domestice/constituţionale" care se exprimă în toate celulele (deoarece codifică proteine esenţiale pentru viaţa celulei), toate celelalte gene au o expresie specific tisulară sau celulară. Aceasta presupune *selecţia* anumitor gene în celulele embrionare diferenţiate şi *menţinerea* acestei expresii diferenţiate în descendenţa lor. Ambele fenomene sunt realizate prin intervenţia unor mecanisme epigenetice şi a unor mecanisme de control la distanţă prin structura cromatinei.

1.1 MECANISMELE EPIGENETICE

În nucleul celulelor, moleculele de ADN formează cu histonele structuri compacte sub forma fibrelor de cromatină. Pentru ca să se iniţieze transcripţia unei gene trebuie ca factorii proteici de reglare să aibe acces la promotorul genei. Aceasta implică o modificare a structurii cromatinei, mai ales în regiunile de eucromatină, active transcripţional. In general este vorba de o serie de *modificari ale histonelor* sau de *metilarea ADN* (mecanism general de menţinere a represiei transcripţiei). Toate aceste **modificari epigenetice** au două trăsături esenţiale: *caracterul reversibil* (care le fac extrem de utile în reglarea expresiei genice) si *potenţialul lor ereditar* (se pot transmite in succesiunea generaţiilor, precum şi în cursul diviziunilor celulare).

a). Modificari ale histonelor

Modificările histonelor (metilare, acetilare, fosforilare şi ubiquitinare) au rol important în reglarea expresiei genice şi reprezintă un marker epigenetic esenţial. Aceste modificări interesează "cozile aminoterminale" ale histonelor, bogate în aminoacizi precum lizina, arginina şi serina, care sunt "ţinta" modificărilor epigenetice. Fiecare dintre modificările menţionate mai sus interesează specific anumiţi aminoacizi.

(1). **Metilarea histonelor** poate avea loc la nivelul mai multor reziduuri de lizină sau arginină ale acestor histone, dar cele mai importante sunt: metilarea la nivelul reziduului Lys4 al histonei H3 (H3-K4) care este asociată cu *expresia activă* a genelor, respectiv metilarea reziduului Lys9 al histonei H3 (H3-K9) care este asociată cu *atenuarea trasncriptiei*. Aceste modificari sunt rezultatul activităţii unor histon-metiltransferaze.

(2). **Acetilarea histonelor** se afla sub controlul unor histon-acetiltransferaze (HAT) care determina o *relaxare* a structurii cromatinei ce favorizează transcripţia si, respectiv a unor histon-deacetilaze (HDAC) care produc o *compactarea* a structurii cromatinei şi suprimarea transcriptiei.

Modificările histonelor se asociază cu modificări ale structurii cromatinei. Cromatina inactivă transcripţional se află într-o conformaţie puternic condensată şi asociată cu fixarea strânsă a histonei H1. In schimb cromatina activă adoptă o conformaţie "*mai deschisă*" produsă de acetilarea histonelor nucleosomale şi, probabil, de hipometilarea citozinei. In sfârşit, exista o serie de **modificări ale cromatinei** induse componenta SWI/SNF a complexului transcripţional care, în prezenţa ATP, desface structura nucleosomilor şi favorizează transcripţia.

b). Metilarea ADN.

Metilarea ADN este al doilea marker epigenetic esenţial. La om, metilarea ADN are loc aproape exclusiv în poziţia 5' a citozinei din cadrul *dinucleotidelor CpG*[31], concentrate în anumite regiuni denumite *insule CpG*, localizate foarte adesea la nivelul regiunilor promotor a numeroase gene, precum şi în interiorul unor gene amprentate (vezi mai jos). Metilarea ADN este guvernată de acţiunea unor **ADN-metiltransferaze** şi, probabil, a unor ADN-demetilaze.

Au fost identificate două clase importante de ADN-metiltransferaze: *DNMT1* este metiltransferaza de menţinere, care metilează dinucleotidele CpG din catenele ADN nascente în cursul procesului de replicare a ADN; funcţia sa este esenţiala în menţinerea modelului de metilare a ADN în succesiunea generaţiilor de celule (figura 4.21). *DNMT3A si DNMT3B* sunt metiltransferaze *de novo*, implicate în stabilirea modelului nou de metilare a ADN în diversele etape ale dezvoltarii. DNMT1 si DNMT3A interacţioneaza cu histon-deacetilazele (HDAC) şi ca urmare pot represa transcripţia. Ca urmare, între metilarea ADN şi deacetilarea histonelor exista o stransă interdependenţă.

Metilarea ADN asociată cu deacetilarea histonelor (care creşte gradul de condensare al cromatinei) reprezintă mecanismul principal de represie al transcripţiei la vertebrate şi poate fi considerată ca "o poziţie standard". Toate secvenţele care sunt transcrise activ trebuie să fie nemetilate (cel putin în regiunea promotor). Pentru aceasta pledează modificările în metilare care au loc în timpul gametogenezei şi dezvoltării embrionare.

Dezvoltarea embrionară precoce necesită capacitatea de a activa numeroase gene, urmată de inactivarea selectivă a unora dintre acestea, pe măsură ce are loc diferenţierea celulară. Aceasta reprogramare a întregului genom a fost demonstrată a apare imediat după fertilizare şi este consecinţa, cel puţin în parte, a unei demetilări rapide a ambelor genomuri parentale asociată cu decondensarea cromatinei şi activarea genelor esenţiale dezvoltării precoce. Demetilarea apare iniţial la nivelul pronucleului masculin şi se pare că prin mecanisme active (intervenţia unor ADN-demetilaze), pentru ca după formarea zigotului să continue pasiv, la nivelul întregului genom nou constituit (figura 4.22). Până în stadiul de blastocist majoritatea genomului este demetilat, excepţie facând genele amprentate (vezi mai jos). După implantarea embrionului au loc fenomene de metilare *de novo* care sunt asociate cu stabilirea diferitelor linii celulare şi, deci, cu diferenţierea celulară. Metilarea apare iniţial la nivelul celulelor interne ale blastocistului care vor forma ulterior viitorul embrion, în timp ce celulele care formeaza trofoblastul (din care deriva placenta, sacul galben etc.) ramân hipometilate.

Metilarea ADN poate interveni în represia expresiei genice prin câteva mecanisme distincte. În primul rând, prezenţa grupărilor metil ataşate ADN poate inhiba legarea unor factori de transcripţie la secvenţele lor ţintă. În al doilea rând, represarea expresiei genice poate fi mediată de către o serie de proteine (MECP2, MBD1, MBD2, etc) etc care au capacitatea de a recunoaşte şi a se lega specific la grupările metil ataşate citozinei.

Cunoaşterea acestor fenomene este departe de a fi încheiată dar consecinţele practice încep să se întrevadă. Vom meţiona două aspecte:

- O serie de proteine implicate în reglarea metilării ADN sau a reglării metil-dependente a expresiei genice au fost identificate recent a fi ţinta mutaţiilor care produc cateva *boli genetice.* Astfel, mutatiile MECP2 sunt responsabile de producerea **sindromului Rett** (OMIM 312750) boală genetică dominantă legată de X, letală la sexul masculin, caracterizată prin dezvoltare neurologică normală până la vârsta de 7-18 luni urmată de o deteriorare rapidă a funcţiilor neurologice cu demenţă, autism, mişcări caracteristice ale mâinilor, ataxie şi microcefalie dobandită. Mutaţiile DNMT3B sunt asociate

[31] Reamintim că litera *p* desemnează aici legatura fosfodiester ce exista intre C şi G şi nu punţile de hidrogen ce se stabilesc între catenele complementare)

sindromului ICF (OMIM 242860), boală autosomal recesivă caracterizată prin anomalii faciale, imunodeficienţă si hipometilarea regiunilor cu ADN satelit ale cromosomilor 1, 9 si 16, cu instabilitatea cromosomilor respectivi.

- O caracteristică a modificărilor epigenetice amintite (modificari ale histonelor si metilarea ADN) este *potenţialul lor reversibil*, ceea ce a condus la posibilitatea dezvoltarii unor noi ţinte terapeutice în diverse boli în care aceste mecanime de reglare sunt perturbate. Aşa sunt azacitidina si decitabina, inhibitori ai metilării ADN sau acidul hidroxamic, inhibitor al histon-deacetilazelor (HDAC).

c) Variaţii în configuraţia ADN

Aşa cum am precizat în capitolul 2.B.2, structura ADN nu este fixă, rigidă. Ea poate suferi o serie de modificări conformaţionale care influenţează interacţiunea dintre anumite secvenţe ale ADN şi diferite molecule exogene reglatoare. **Supraînrularea ADN** (controlată de *topoisomeraze*) ar face bazele din regiune promotor a genelor mai accesibile proteinelor reglatoare. Mutaţiile genelor pentru *topoisomeraze* sau inhibitorii acestor enzime produc o diminuare importantă a transcripţiei unor gene.

Trecerea de la forma B a ADN unor gene la **forma Z a ADN** ar putea fi vitală pentru reglarea activităţii genice. Astfel, la nivelul unei gene care codifică o componentă a sistemului imun s-a dovedit că secvenţa reglatorie din regiunea promotor este mai întâi convertită în forma de ADN-Z şi abia apoi este activată. Spre deosebire de concepţia clasică se consideră că trecerea tranzitorie în configuraţia Z ar face secvenţele ADN mult mai accesibile la factorii de transcripţie.

Au fost identificate şi alte variaţii de la forma elicoidală clasică a ADN. Astfel, porţiunea monocatenară a ADN, cu care se termină telomerele fiecărui cromsomom, formează o buclă care se plicaturează şi determină un aspect de **quadruplex** (quadruplex G). Asemenea structuri au fost însă identificate şi în alte regiuni ale ADN bogate în G; de exemplu, în imediata vecinătate a genei c-MYC, implicată în producerea multor cancere. Mutaţiile care determină abolirea acestei structuri au drept consecinţă activarea acestei oncogene.

In sfârşit, există situaţii în care expresia unor gene este asociată cu o adevarată **reconfigurare a genomului** produsă prin *recombinari somatice*. Aşa este cazul genelor implicate în sinteza imunoglobulinelor sau a receptorilor TCR.

1.2 IMPLICAŢII ALE MECANISMELOR EPIGENETICE ÎN CONTROLUL EXPRESIEI GENICE

a) Controlul la distanţă al expresiei genice

La eucariote majoritatea genelor sunt transcrise individual. Totuşi s-au descris elemente cis-active care exercită un control la distanţă asupra unei regiuni cromosomice ce conţine un grup de gene, a căror activitate va fi reglată în mod coordonat. De asemenea, foarte probabil, cromosomii sunt organizaţi în *domenii funcţionale de expresie genică* (domenii de cromatină) active (eucromatină) sau inactive (heterocromatină), separate de *elemete de graniţă* (numite şi *"insulators"*) ce împiedică răspândirea efectelor secvenţelor activatoare (enhancer) şi atenuatoare (silencer) de la o regiune la alta. se pare că există o organizarea funcţională a cromosomilor în domenii cromatiniene cu expresie genică diferită.

(1). Reglarea expresiei genelor prin "efecte de pozitie"

O dovadă elegantă a existenţei unor domenii de cromatină cu activităţi transcripţionale diferite a fost adusă de rearanjamentele cromosomice care, atunci când repoziţionează o genă activă în proximitatea unor blocuri de heterocromatină centromerică sau telomerică, pot suprima expresia genică. Acest **efect de poziţie** demonstrat iniţial la Drosophila a fost identificat recent şi la om. Astfel, în **distrofia musculară facio-scapulo-humerală**, boală

neuromusculară progresivă, autosomal dominantă, gena FSHD este situată aproape de telomerul cromosomului 4q; în cazul în care se produce o deleţie a segmentului intercalar aflat între genă şi blocul de heterocromatină telomerică se reduce distanţa dintre ele, gena este represată printr-un efect de poziţie. Fenomene asemănătoare s-au descris şi în alte boli.

Existenţa unor secvenţe nucleotidice care controlează la distanţă un domeniu de cromatină mai larg a rezultat din studiul bolilor asocite cu rupturi cromosomice. Astfel, activitatea genelor *PAX6* de pe 11p13 şi *SOX9* de pe 17q24 poate fi suprimată prin rupturi produse la sute de Kb de aceste gene (care sunt normale şi nemodificate ca localizare); este vorba de un efect la distanţă analog efectului de poziţie descris mai sus.

(2). Reglarea coordonată a expresiei genelor (*"locus control region"*)

Se presupune că unul din efectele diferenţierii celulare este de a *selecta genele* ce vor fi transcrise într-o anumită celulă şi *de a le plasa într-o configuraţie spaţială specială* (de tipul unei bucle cromatiniene) care face promotorii genelor din această structură mai accesibili la ARN polimerază şi la factorii de transcripţie. S-a demonstrat, de exemplu, că genele din familia alfa-globinei (ζ, α1, α2) şi familia beta-globinei (ε, γ, δ şi β) sunt situate una după alta (vezi figura 3.13) în aceeaşi buclă cromatiniană. Expresia lor în linia eritroidă este determinată de nişte situsuri situate la extremităţile buclei (regiunea **LCR** de la *Locus Control Region*), direct accesibile proteinelor reglatoare. Această regiune asigură reglarea temporală şi specificitatea tisulară a expresiei genelor din familia β-globinei: genele globinelor sunt activate într-o secvenţă temporală precisă, în anumite stadii ale dezvoltării ontogenetice, care corespunde cu ordinea lor lineară pe cromosom

În cursul dezvoltării umane se sintetizează forme diferite de hemoglobină – embrionară, fetală, adultă (vezi caseta 3.3). La această *diversitate ontogenetică* a tipurilor de Hb se adaugă şi faptul că procesul de sinteză a Hb are loc în *situsuri diferite* în diferite perioade (sac galben, ficat, splină, măduvă osoasă). Ambele fenomene implică activarea şi inactivarea secvenţială, în momente precise şi ţesuturi variate, a diferitelor gene ce alcătuiesc familia alfa-globinei (ζ, α1, α2) şi beta-globinei (ε, Gγ, Aγ, δ şi β); acest proces de *„comutare a hemoglobinei"* (*„hemoglobin switching"*) permite sinteza subunităţii adecvate de hemoglobină pentru o anumită perioadă de dezvoltare (figura 3.14).

Mecanismele care determină expresia unei anumite gene într-o anumită perioadă şi ţesut implică secvenţele de reglare din regiunea promotor a fiecărei gene precum şi o secvenţă reglatoare comună numită *Locus Control Region (LCR)* situat în amonte de genele de structură. *LCR* este necesar pentru a stabili care genă din grup se va exprima într-o anumită perioadă de timp şi în ce ţesut. Interesant este faptul că în familia β globinei expresia temporală a genelor se face *în direcţia 5'→3', în ordinea (ε→γ→β) în care se găsesc pe cromosom*, faţă de *LCR*. De asemenea s-a stabilit că *LCR* pentru globină are mai multe secvenţe *cis-reglatoare* pe care se fixează factorii de transcripţie GATA-1 şi NFE-2 ce determină expresia genelor numai în celulele eritroide. Fixarea factorilor de transcripţie la *LCR modifică structura cromatinei* la nivelul genelor beta, permiţând altor TF să acceseze gene individuale din grup. Apoi, între factorii de transcripţie (TF) fixaţi pe *LCR* si TF fixaţi pe promotorul unei anumite gene are loc o interacţiune (inclusiv o apropiere fizică, prin realizarea unei bucle în ADN) care activează sau represează transcripţia unei anumite gene. Comutările de expresie în anumite ţesuturi se fac de asemenea prin intervenţia unor TF specifici tisulari.

Abilitatea unei singure regiuni de control, cum este *LCR*, să regleze un grup de gene şi nu una singură, reprezintă un nivel superior de control al expresiei genice[32]. Controlul combinat prin LCR şi TF specifici în diferite ţesuturi produc o comutare ordonată a sintezei Hb în cursul dezvoltării.

b). Expresia monoalelică

La majoritatea genelor, ambele alele maternă şi paternă se exprimă (la nivel molecular); nu există nici-o discriminare între ele (dacă nu intervine o mutaţie deci o diferenţă genetică). Totuşi, la om mai multe gene bialelice exprimă *în mod normal* numai una din cele două alele parentale, fie cea maternă, fie cea paternă; prin această **excluzie alelică** sau **expresie monolelică** se produce un fel de *hemizigoţie funcţională*. Deşi iniţial era considerată

[32] Asemenea mecanisme s-au descris şi pentru alte grupe de gene (de ex., genele pentru receptorii celulelor T)

o raritate, expresia monoalelică a fost demonstrată la mai multe gene şi se poate împărţi în două categorii:

- Excluzia alelică în funcţie de originea parentală, reprezentată de fenomenul de amprentare genomică;
- Excluzia alelică independentă de originea parentală; decizia de excludere, prin represie, a uneia din cele două alele este "întâmplătoare" dar definitivă, se transmite ca atare celulelor fiice; în acest grup se încadrează:
  - excluderea alelică prin inactivarea cromosomului X;
  - excluderea alelică după un rearanjament ADN programat (de exemplu, expresia genelor imunoglobulinelor în limfocitele B sau a receptorilor celulelor T în limfocitele T)
  - excluderea alelică prin mecanisme necunoscute (de exemplu, genele receptorilor olfacivi în neuroni ş.a.)

(1). Amprentarea genomică

Fenomenul de amprentare genomică se referă la prezenţa unor modificări epigenetice cromosomice care pot avea drept consecinţă expresia într-o manieră dependentă de originea parentală a genelor. Amprentarea genomică a fost identificată prin studii de partenogeneză care au dovedit faptul ca genomul patern şi matern nu sunt echivalente. Ulterior au fost identificate o serie de boli produse ca urmare a disomiei uniparentale a unor cromosomi, adică moştenirea ambelor copii ale unui cromosom de la acelaşi părinte. Studiul unor asemenea boli a permis identificarea primelor gene amprentate.

Bolile genetice asociate unor tulburari ale genelor amprentate se caracterizează prin manifestări fenotipice care depind de originea parentală a defectului genetic. Cele mai bine caracterizate asemenea sindroame sunt sindroamele Beckwith-Wiedemann (cromosomul 11p15.5) si Prader-Willi/Angelman (15q11-13).

Sindromul Beckwith-Wiedemann (OMIM 130650) este caracterizat prin gigantism, macroglosie, omfalocel şi predispoziţie pentru dezvoltarea unor tumori. Boala este asociată cu expresia bialelică a genei pentru *factorul de crestere insulin-like tip 2* (IGF2), genă exprimată în mod normal numai de pe cromosomul patern, sau prin mutaţii ale unei alte gene amprentate din vecinătate, CDKN1C.

În cazul sindroamelor Prader-Willi si Angelman sunt implicate cel mai adesea deleţii largi ale regiunii cromosomice 15q11-13.

- Atunci când defectul interesează cromosomul de origine paternă manifestarile clinice corespund **sindromului Prader-Willi** (OMIM 176270) caracterizat prin obezitate, hipostatură şi retard mintal moderat. Genele incriminate sunt SNRPN şi necdina, ambele cu expresie de pe cromosomul patern.
- Defectele care interesează cromosomul de origine materna determină **sindromul Angelman** (OMIM 105830) caracterizat prin ataxie, hiperactivitate, retard mintal sever cu lipsa vorbirii şi crize de râs. In unele cazuri boala este determinată de defecte ale genei UBE3A care este exprimată exclusiv matern la nivel cerebral.

In ultimii ani au fost identificate cel puţin 40 de gene amprentate (o listă a genelor amprentate la om poate fi gasită pe Internet la adresa: *www.geneimprint.com*). Acestea sunt localizate grupat, în anumite regiuni cromosomice (de exemplu grupările de pe cromosomii 11p si 15q). Genele amprentate au o serie de trăsături comune:

- expresia monoalelică care depinde de originea parentală (expresia fie numai a alelei materne, fie numai a alelei paterne),
- prezenta unor insule CpG în regiunea promotor sau într-un intron care suferă metilare diferenţiată (dependentă de asemeni de originea parentală),
- prezenţa frecventă a unor molecule de ARN care sunt transcrise de pe catena ADN opusă (ARN antisens) – cu rol important în reglarea expresiei acestor gene.

Expresia monoalelică a genelor amprentate este un fenomen extrem de complex. Numeroase gene prezintă acest model monoalelic doar în anumite etape ale dezvoltării ontogenetice sau doar în anumite ţesuturi. De exemplu, gena IGF2 este exprimată bialelic în cursul dezvoltarii embrionare precoce (şi aceasta favorizează procesele de creştere caracteristice acestei etape), pentru a dobândi apoi expresie exclusiv de pe cromosomul patern; exceptie fac unele ţesuturi (ficat etc.) în care se pastrează expresia bialelică.

Genele amprentate sunt implicate în controlul unor procese extrem de importante în cursul dezvoltarii şi, ca urmare, alterarea expresiei normale a acestora (fenomen denumit **pierderea amprentarii** – de la *loss of imprinting* – LOI) este asociată cu numeroase boli, precum cancerele sau bolile asociate cu tulburări de comportament.

(2). Inactivarea cromosomului X la femei

La femeile XX compensarea dozajului genic (faţă de bărbaţii XY) este realizată prin inactivarea unui cromosom X, fenomen care apare precoce în cursul dezvoltarii embrionare. Procesul de inactivare converteşte un cromosom X din forma de eucromatină activă într-o formă heterocromatiniană puternic condensată şi inactivă transcripţional (cromatina sexuala X sau corpusculul Barr în celulele epiteliale bucale). Inactivarea nu interesează cromosomul X în intregime: regiunile pseudoautosomale de la extremităţile comosomului X pot ramane active ca şi o serie de gene de-a lungul cromosomului. Acest proces de inactivare este eminamente epigenetic si este controlat de un **centru de inactivare XIC,** care a fost identificat la nivelul porţiunii proximale a bratului lung (Xq13). La scurt timp după implantarea embrionului feminin, la acest nivel, pe unul din cei doi cromosomi X se constată creşterea marcată a expresiei genei XIST (de la *X inactivation specific transcript*) care codifică o moleculă de ARN netranscrisă. Acest tip particular de ARN "imbracă" cromosomul X şi acest fenomen este esenţial în cadrul procesului de inactivare.

Deşi gena XIST este esenţială pentru inactivarea cromosomului X, expresia sa nu este suficientă pentru realizarea acestui proces complex. Catena opusă celei de pe care este transcrisă gena XIST contine informaţia codificată pentru o moleculă antisens numită TSIX, care reglează în cis expresia XIST. Alte modificari asociate cromosomului X inactiv sunt *metilarea ADN,* in special la nivelul promotorilor genelor, *hipoacetilarea* histonei H4, *metilarea* Lys9 a histonei H3 şi asocierea cu unele variante histonice precum macroH2A1 şi macro H2A2.

La om inactivarea cromosomului X este considerată a fi *întâmplătoare*[33]. Totuşi, în cazul unor anomalii cromosomice care interesează un cromosom X (precum deleţiile unuia dintre cromosomii X sau translocaţii X-autosomale) se observă *o inactivarea preferнţială,* neîntamplătoare, a cromosomului X normal. În aceste cazuri se consideră că fenomenul de inactivare s-a produs la întâmplare dar rezultatul final este consecinţa unor procese de selecţie secundară în cursul dezvoltarii embrionare precoce a acelor celule care sunt caracterizate printr-un echilibru genetic mai bun. Cu toate acestea, mai recent au fost identificate şi cazuri aparent idiopatice de inactivare preferenţială a unui dintre cei doi cromosomi X, a căror etiologie genetică a fost documentată.

(3). Expresia monoalelică prin excluzia întâmplătoare a unei alele

Expresia monoalelică datorată amprentării genetice intereseaza un numar relativ redus de gene. Cu toate acestea, expresia monoalelică este un fenomen relativ frecvent întâlnit la nivelul genomului uman. In acest caz este însă vorba despre **excluzia alelică**, fenomen care se referă la expresia unei gene de la nivelul unui singur cromosom din perechea de omologi, fără a se ţine cont de originea parentală a acestuia. Expresia poate deci interesa cromosomii materni în unele celule şi cromosomii paterni în alte celule. Acest mod de expresie este însă păstrat fix în cursul succesiunii generaţiilor de celule.

Deşi nu este bine înţeles, fenomenul de excluzie alelică implică cu siguranţă mecanisme epigenetice care au permis coordonarea expresiei unor gene aflate la distanţă în

[33] La unele mamifere există dovezi privind implicarea unor fenomene de amprentare.

genom. In unele cazuri excluzia alelică este foarte probabil şi consecinţa unor rearanjamente cromosomice care apar la nivel somatic. Asa este cazul expresiei monoalelice întâlnite în cazul genelor care codifică imunoglobulinele în limfocitele B sau receptorii TCR la nivelul limfocitelor T (vezi şi capitolul Imunogenetica). Expresia monoalelică este intalnită şi în cazul genelor legate de X la femei, dar în acest caz este explicată de inactivarea întâmplătoarea a unuia din cei doi cromosomi. Un exemplu foarte complex il reprezintă genele care codifică receptorii olfactivi la nivelul neuronilor mucoasei nazale. Familia genelor pentru receptorii olfactivi este cea mai mare familie de gene la om, continând peste 1000 de copii organizate în circa 25 de grupuri (clusters) la nivelul a numeroşi cromosomi. În fiecare neuron olfactiv are loc expresia unui singur asemenea grup de gene, şi aceasta implică existenţa unor fenomene de reglare a expresiei genice capabile să acţioneze la nivelul întregului genom.

2. REGLAREA TRANSCRIPŢIONALĂ.

Controlul transcripţional al expresiei genice vizează reglarea activităţii ARN polimerazei II, enzima ce transcrie genele care codifică proteine şi sintetizează ARNm. Reglarea transcripţională implică interacţiunea unor proteine (*factori trans-reglatori*) cu secvenţe specifice de pe ADN (*elemente cis-reglatoare*), interacţiune care determină transcripţia specifică a *anumitor gene* într-un anumit *moment* pentru a se produce o *cantitate* adecvată dintr-o anumită proteină.

2.1. ELEMENTELE CIS-REGLATOARE

Elementele cis-reglatoare sunt secvenţe scurte de ADN ale căror funcţii sunt limitate la o anumită genă; după fixarea unor factori "trans-reglatori" specifici (factori de transcripţie), aceste secvenţe permit recunoaşterea genei de către ARN polimerază şi reglează specificitatea şi intensitatea transcripţiei, adaptând-o la nevoile celulare

Reamintim (vezi capitolul 3.B.1.2) că unele elemente cis-reglatoare au o localizare perfect definită în promotorul genei: *TATA box, CAAT box, GC box*; pe aceste secvenţe se fixează factorii de transcripţie generali care formează, împreună cu ARN polimeraza, complexul de iniţiere a transcripţiei sau *complexul transcripţional bazal* (vezi capitolul 4.C.1.2). Alte secvenţe (situate mai în amonte) conferă *specificitatea tisulară* a expresiei genelor ce le posedă iar *secvenţele RE*[34] (de la "responsive element") care fixează factori transcripţionali inductibili, activaţi în prealabil de către un stimul extracelular: hormoni, AMPc, ioni etc. Ultimul tip de secvenţe au o *localizare variabilă* (în regiunea 5' sau în 3' sau în introni) şi reglează intensitatea transcripţiei; ele pot fi *secvenţe stimulatoare* ale transcripţiei *(enhancers)* sau *secvenţe atenuatoare (silencers).*

Se poate spune că regiunile reglatoare ale unei gene sunt constituite dintr-o serie de *module* pe care se fixează *factorii de transcripţie* realizând o *anumită combinaţie*; prin interacţiunea lor se produce o *repliere a cromatinei* care creează o structură spaţială ce permite ARN polimerazei să se *poziţioneze* lângă situsul de iniţiere a transcripţiei şi să declanşeze procesul de transcripţie cu o anumită viteză.

Fiecare genă posedă "un sistem de reglare" alcătuit din *mai mulţi factori transcripţionali* care nu sunt însă specifici unei singure gene. Numărul lor este mic dar acţiunea lor particulară este produsă prin *combinaţia specifică* a anumitori factori trans şi elemente / secvenţe cis**.** Situaţia este comparabilă cu scrisul sau muzica în care un număr limitat de simboluri sau sunete permite o infinitate de combinaţii diferite.

---

[34] Pentru a indica activatorul unui RE se adaugă o literă suplimentară: **G**RE pentru elementul de răspuns la glucocorticoizi; **E**RE pentru răspunsul al estrogeni, **T**RE pentru hormonul tiroidian, **A**RE pentru androgeni, **C**RE pentru răspunsul la AMPc etc

2.2. FACTORII DE TRANSCRIPŢIE TRANS-REGLATORI

Factorii de transcripţie trans-reglatori sunt proteine reglatoare care se fixează pe elementele cis-reglatoare ale ADN (de regulă, în marea încizură a dublei elice aADN) şi interacţionează cu alţi factori de transcripţie, controlând iniţierea transcripţiei[35].

Toate aceste proteine transcripţionale conţin un *domeniu de fixare la ADN* prin intermediul cărora proteina recunoaşte atât genele "ţintă" cât şi *domeniul de transactivare* prin care interacţionează cu alţi factori de transcripţie pentru a regla transcripţia. Unele proteine *trans* pot conţine un al treilea domeniu care este un situs de fixare pentru hormon, ioni etc. Domeniul de fixare la ADN are o structură particulară de aminoacizi ce formează un "*motiv structural" specific*; în funcţie de alcătuirea sa, există mai multe tipuri de factori de transcripţie (figura 4.23).

- **Proteine cu"degete de zinc",** în care aminoacizii se dipun spaţial sub forma unor degete de mănuşă (2-13) la baza cărora se fixează (de cisteină şi/sau histidină) un ion de Zn^{++}, indispensabil activităţii proteinei; din această categorie fac parte receptorii nucleari de hormoni, proteina Sp1 care se fixează pe promotorul a numeroase gene *"domestice" (menajere)* ;
- **Proteine "elice-cot-elice**, în care aminoacizii ce alcătuiesc domeniul de fixare la ADN formează două elice α unite între ele printr-un "cot" β; acest tip de structură (numit şi *homeodomeniu)* se întâlneşte într-o serie de proteine implicate în dezvoltare, numite *homeoproteine: proteinele HOX, SOX etc;*
- **Proteine "elice-buclă-elice**" sunt proteine dimerice alcătuiţi dintr-un domeniu de fixare specifică la ADN, o elice α, o buclă laterală şi o altă elice α; cele două molecule ce formează dimerul se leagă prin interacţiuni ce se stabilesc între zonele din elice; astfel de structuri sunt prezente la proteinele care stimulează sinteza de imunoglobuline;
- **Proteine cu "fermoar de leucină"** (*"Leucin zipper"*) sunt proteine dimerice, alcătuite dintr-un domeniu de fixare specifică la ADN şi un domeniu în α elice, bogat în leucină, care interacţionează cu domeniul omolog al celeilalte catene; exemple: proteina CREB, produsele oncogenelor *JUN* şi *FOS*.

De menţionat că factorii de transcripţie diferiţi pot conţine domenii similare de fixare la ADN dar au domenii diferite de trans-activare; în acest caz TF se fixează la aceeaşi secvenţă de ADN dar activează transcripţia în mod diferit. Există şi situaţia inversă: TF cu domenii diferite de fixare la ADN si cu domenii identice de trans-activare.

Factorii de transcripţie se pot clasifica în cinci grupe.

(1) Factori de transcripţie *generali* (GTF sau TFII); se asamblează pe secvenţa TATA;
(2) Factori de transcripţie *comuni* care se fixează la secvenţele CAAT şi GC;
(3) Factori de transcripţie *inductibili* care după ce sunt activaţi de către stimuli externi se fixează pe secvenţele RE, producând o creştere a transcripţiei genelor ce posedă RE;
(4) Factori de transcripţie *specifici* pentru anumite celule (de exemplu Pit-1, factorul specific glandei hipofize);
(5) Proteine activatoare sau represoare care se fixează pe activatori (enhancers) sau atenuatori (silencers) şi intensifică sau inhibă transcripţia genei.

Factorii de transcripţie generali (GTF) se asamblează pe TATA box într-o ordine secvenţială pentru a forma *complexul transcripţional bazal* care fixează, poziţionează şi activează ARN polimeraza II (de aceea se mai numesc TF II) (figura 4.24 A) .

Primul se fixează TF IID, un complex multiproteic) care se leaga la TATA prin proteina TBP; apoi se fixează în ordine: TFIIA,TDIIB,TFIIF/ARN polimeraza, TFIIE şi TFIIH. Unii din aceşti factori au şi alte activităţi: de helicază, de protein-kinaze, asemănătoare ciclinelor, de reparare a ADN (TFIIH).

[35]Se numesc "trans" pentru că sunt proteine produse de alte gene decât cele asupra cărora acţionează.

Factorii de transcripţie comuni activează/intensifică asamblarea GTF şi ARN polimerazei la miezul promotorului. Ei se fixează la secvenţele CAAT, GC, OCT şi apoi interacţionează prin domeniul lor trans-activator cu TFIID intensificând asamblarea complexului de iniţiere al transcripţiei. De eemplu., TF Sp1 se leagă pe GC prin intermediul unui domeniu de fixare cu "degete de zinc"; apoi domeniul de transactivare recunoaşte o componentă a TFIID şi-l activează (figura 4.24 B).

Factorii de transcripţie inductibili sunt activaţi în prezenţa unui stimul specific (glucocorticoizi; TPA; estrogeni; calciu; metale grele) din mediul exterior şi apoi se fixează la un element de răspuns (RE) specific (GRE; TRE; ERE; Ca^{++}RE), stimulând transcripţia. Acest mecanism funcţionează în anumite tipuri de gene.

De exemplu, TF inductibil AP1 este sintetizat într-o formă inactivă (fosforilată); în prezenţa unui stimul – de tipul TPA (ester de forbol), factori de creştere, citokine sau neurotransmiţători; el activează cascada protein kinazei C, care produce defosforilarea AP1 şi activarea sa; aceasta îi permite să se fixeze la promotorii genelor care conţin secvenţa TRE. După fixarea la ADN, AP1 interacţionează cu complexul transcripţional bazal şi creşte rata de iniţiere a transcripţiei. Un alt exemplu frumos de transcripţie inductibilă este răspunsul celulelor la hormonii steroizi, un proces care implică fixarea hormonului (H) la un receptor(R) şi apoi fixarea H-R la un RE specific (GRE, ERE, etc) (Castea 4.2).

CASETA 4.2.

Controlul transcripţiei mediat de receptori

Hormonii steroizi (gluco-, mineralo-, sex-steroizi) şi elementele similare (de exemplu, vitamina D) controlează creşterea, dezvoltarea şi homeostazia corpului uman. Secretaţi de celulele endocrine, steroizii ajung prin sânge la celulele „ţintă". Fiind liposolubili, ei traversează membrana celulară şi, ajunşi în interiorul celulei, se fixează pe un receptor hormonal specific, prezent fie în citoplasmă (de exemplu, receptorii pentru glucocorticoizi) fie în nucleu (de exemplu, receptorii de androgeni) (figura 4.25). Receptorii hormonilor steroizi sunt factori de transcripţie care au un domeniu de fixare a hormonului şi un domeniu de fixare la ADN ce conţine motive sub formă de „degete de zinc". Complexul activ receptor steroid se fixează în nucleu la situsurile RE corespunzătoare (HRE) şi – prin interacţiunea dintre receptor şi TF din complexul bazal de transcripţie - este activată iniţierea transcripţiei unei clase specifice de gene (care au HRE)

Factorii de transcripţie specific tisulari sunt deseori reprezentaţi de secvenţele *activatoare* sau *atenuatoare (inhibitorii).* De exemplu: activatorii genelor imunoglobulinelor funcţionează numai în limfocitele B; represorul *neural restrictive silencer element* (NRSE) inhibă activitatea unor gene în toate ţesuturile, exceptând ţesutul nervos; aici un factor de transcripţie specific, REST, produce blocarea elementului NRSE. Alteori intervin secvenţe şi *factori de transcripţie specifici* anumitor ţesuturi. De exemplu, TF specifici celulelor eritroide (NF-E2 sau GATA) se fixează pe secvenţe specifice de ADN din promotor şi iniţiază transcripţia anumitor gene în eritroblast; TF specifici pentru celulele pancreatice beta (PDX1) se fixează pe secvenţele A1,A2,A3 ale promotorului insulinei.

Factorii de transcripţie care se fixează pe activatori sau atenuatori ridică o problemă interesantă: cum pot controla transcripţia unei gene secvenţe situate la mii de pb de genă, în amonte sau în aval de situsul de iniţiere (deci indiferent de orientare). Ipoteza cea mai probabilă presupune că TF fixat pe secvenţa activator interacţionează cu o componentă a complexului bazal de trascripţie şi determină formarea *unei bucle a ADN* care aduce cele două secvenţe în strânsă apropiere (figura 4.24 b).

2.3. REGLAREA TRANSCRIPŢIEI CA RĂSPUNS LA SEMNALE EXTRACELULARE ("EXPRESIA INDUCTIBILĂ A GENELOR").

O varietate de mecanisme realizează reglarea transcripţională ca răspuns la *semnale*[36] *(stimuli) extracelulari,* numiţi generic **liganzi**; aceştia produc o modificare *temporară şi reversibilă* a transcripţiei unor gene ("expresia *inductibilă* a genelor"). Indiferent de mecanism, punctul final în acest tip de reglare este acelaşi: un factor de transcripţie iniţial *inactiv* este activat specific de către calea de semnalizare şi apoi se fixează la secvenţele reglatoare specifice (numite **elemente de răspuns) (**RE) din promotorul genelor ţintă, activând transcripţia lor. Pentru a răspunde imediat la un stimul, factorul transcripţional necesar trebuie să fie deja *prezent în celulă sub o formă inactivă*. Activarea sa se poate face prin mai multe procese.

a). Activarea transcripţiei printr-un ligand inductibil (controlul hormonal al transcripţiei)

Hormonii hidrofobi cu moleculă mică (de exemplu, hormonii steroizi) sau unele *morfogene* (de exemplu, acidul retinoic) difuzează prin membrana celulelor-ţintă şi se fixează pe un **receptor intracelular**, citoplasmatic sau nuclear; ei funcţionează ca factori de transcripţie inductibili (figura 4.25). Fixarea ligandului la receptor produce activarea lui; complexul ligand (hormon) receptor se fixează pe ADN la RE (elementul de răspuns) (GRE, TRE, ERE, ARE) localizat în promotorul mai multor gene ţintă şi activează transcripţia lor.

Receptorii steroizi fac parte din *superfamilia receptorilor nucleari de hormoni.* Aceşti receptori au o structură globală identică, fiind alcătuiţi din mai multe domenii: domeniul A de lungime variabilă şi specific de receptor; domeniul B cu o structură *în degete de zinc,* foarte asemănătoare la diferiţi receptori, prin care receptorul *se fixează la ADN*; domeniul C; domeniul D (relativ asemănător) unde se *fixează hormonul*.

b). Activarea transcripţiei prin transducţia semnalului.

Anumiţi factori extracelulari (hormoni peptidici, citokine, neurotransmiţători) pot declanşa transcripţia unor gene fără a intra în celule (nu pot trece prin membrana plasmatică). Ei se fixează pe un **receptor specific de pe suprafaţa celulei** (cu activitate kinazică sau care poate activa kinaze intracelulare) care, după fixarea ligandului, îşi schimbă conformaţia spaţială şi devine activ; în această stare el transmite semnalul ligandului altor molecule din celulă. Prin activarea transcripţiei unor gene specifice, acest proces, numit **transducţia semnalului,** joacă un rol important în controlul diviziunii celulare, creşterii şi diferenţierii.

Există două mecanisme posibile de transducţie:

- *Transducţia directă* când receptorul („cu un pasaj membranar") dotat cu activitate tirozin-kinazică (recepor RTK) recunoaşte semnalul extracelular şi îl *traduce el însuşi*, declanşând autofosforilarea unei molecule de tirozină (Tyr) din segmentul său intracitoplasmatic;
- *Transducţia indirectă* în care receptorul („cu şapte pasaje membranare") este *cuplat* cu un o proteină care, prin interacţiuni cu alte proteine, transmite semnalul *efectorului*, în cazul de faţă unui factor de transcripţie inactiv, situat în citoplasmă sau nucleu.

(1). Calea directă de transmitere a semnalului prin cascada kinazelor

Receptorul RTK (**r**eceptor cu activitate **T**yr-**k**inază) este alcătuiră dintr-un domeniu extracelular care are situsul de recunoaştere al ligandului, un domeniu transmembranar şi un

[36] Se deosebesc patru tipuri de semnalizare celulară: (1) Semnalizarea directă, celulă-celulă: un semnal de pe suprafaţa unei celule (de exemplu, factor de creştere) este fixat de un receptor specific al altei celule; (2) Semnalizarea endocrină: hormonii se fixează pe receptori specifici în celulele ţintă; (3) Semnalizarea paracrină: o moleculă eliberată de o celulă (de ex., un neurotransmiţător) acţionează local asupra celulelor vecine; (4) Semnalizarea autocrină: o moleculă produsă de o celulă acţionează asupra celulei respective.

domeniu intracitoplasmatic dotat cu proprietăţi enzimatice de Tyr-kinază. Există o mare diversitate de RTK dintre care în figura 4.26 sunt reprezentate cele mai importante clase (receptorii pentru EGF, Insulină, PDGF, FGF).

Fixarea unui ligand pe receptorul (cu un pasaj membranar) acestei căi declanşează o serie de reacţii intracelulare în lanţ care vor duce în final la transcripţia genelor implicate în diviziunea celulară (figura 4.27). Fixarea ligandului produce o *dimerizare* a RTK care stimulează activitatea TK intrinsecă receptorului şi declanşează *autofosforilarea Tyr* situată în domeniul intracitoplasmatic. Tyr fosforilată este recunoscută de proteina[37] *GRB2* (de la *growth factor receptor bound*) legată cu proteina *SOS*; *GRB2* este deci un adaptor între RTK şi *SOS*; care poziţionează o proteină *SOS*. Proteina *SOS* este acum poziţionată la extremitatea substratului său, care este *proteina P21 (*codificată de gena *RAS),* o proteină ancorată pe faţa internă a membranei celulare; *sos* facilitează astfel activarea *P21 RAS-GDP*. Proteina *RAS,* activată prin legarea cu GTP (graţie lui SOS), poate acţiona asupra mai multor tipuri de efectori; cel mai cunoscut este kinaza *RAF-1* care (sub acţiunea P21-RAS-GTP) suferă o modificare a localizării sale (o translocare), ajungând în contact cu membrana celulară, fosforilată şi activată. Ea va determina *activarea în cascadă* a altor kinaze, MEK şi MAPK. În final MAPK activată este translocată în nucleu unde fosforilează mai mulţi factori de transcripţie ca **fos, jun, myc,** care vor *controla expresia genelor implicate în diviziunea celulară.*

De precizat că domeniul citoplasmatic al RTK posedă *mai multe molecule de Tyr* care se pot autofosforila independent; aceasta va face ca fiecare moleculă Tyr fosforilată să fie recunoscută de altă proteină (diferită de GRB2) producând *răspunsuri biologice diferite* în tipuri celulare diferite. Invers, două RTK diferite (de ex., EGF-R şi PRGF-R) pot avea o aceiaşi moleculă Tyr ce se va fosforila, activând o aceeaşi cale de semnalizare.

(2). Calea directă de transmisie a semnalului prin kinaza „Jak”[38]

O cale mai scurtă de transmisie a semnalului (folosită de unii factori de creştere sau citokine) implică proteinele *JAK* (figura 4.28). Fixarea ligandului la RTK activează *JAK1,*o Tyr-kinază citoplasmatică, care la rândul ei fosforilează o Tyr a unui factor de transcripţie *STAT* (de la *signal transducer and activator of transcription*). Acest factor activat patrunde în nucleu şi stimulează transcripţia unor gene, în special a genei **c-fos.**

(3). Calea indirectă de transmitere a semnalului, prin receptorii de suprafaţă cu şapte pasaje membranare, cuplaţi cu proteine G

Cea mai mare familie de receptori membranari (câteva sute) este constituită din receptorii cu şapte pasaje transmembranare (receptori pentru proteine, amine, cationii de Ca^{++}, fotoni etc). Segmentele transmembranare delimitează o cavitate unde se gaseşte de obicei situsul de legare. Receptorii sunt cuplaţi cu intermediari (de obicei *proteine G heterotrimerice*) între receptorul care primeşte semnalul şi efectorul (factorul de transcripţie inactiv) responsabil de acţiune. (Robbell şi Gilman, Premiul Nobel 1994).

Activarea transcripţiei pe această cale foloseşte două mecanisme ce permit transmiterea rapidă a semnalului de la receptorii de suprafaţă la nucleu, ambele implicând fosforilarea proteinelor.

- În primul mecanism, receptorul cuplat cu o proteină G (de la **G**TP–binding regulatory proteins) activează anumite protein kinaze care apoi sunt translocate din citoplasmă *în nucleu* unde fosforilează factorii de transcripţie ţintă. Exemplul cel mai edificator este **semnalizarea hormonală pe cale AMP ciclic**.

---

[37] Este vorba de un tip special de proteine , cu domenii SH2/SH3 care au nişte „buzunare” ce recunosc specific o Tyr fosforilată.

[38] Denumirea „JAK” provine de la „Janus kinase” şi face aluzie la Janus, zeul roman cu 2 feţe, care era zeul porţilor.

Prin fixarea hormonului la receptorul cuplat cu proteina G (heterotrimerică - α,β,γ- în care subunitatea α este legată la GDP) se produce o modificare conformaţională care permite activarea şi disocierea subunităţii α a proteinei G (figura 4.29 A); subunitatea α+GTP va activa adenilat-ciclaza, fixată de membrană, care va sintetiza (din ATP) AMP ciclic, **mesagerul secund** al diferitor hormoni şi altor molecule de semnalizare. AMPc va activa, prin intermediul protein kinazei A, un factor specific de transcripţie, CREB (de la CRE-binding protein), care se va fixa pe elementul de răspuns al AMPc numit CRE si situat în promotorul unor gene, declanşând transcripţia lor.

- În al doilea mecanism, factorii de transcripţie *inactivi* se găsesc *în citoplasmă* şi, după activarea lor prin fosforilare, ei sunt translocaţi în nucleu, unde declanşează transcripţia.

  Un exemplu pentru acest mecanism este *activarea NF-kB pe calea de semnalizare a protein kinazei C* (figura 4.29 B).

  NF-kB este un factor de transcripţie implicat în activarea diferitelor gene ale imunităţii, care se găseşte în citoplamă sub formă inactivă datorită cuplării cu IkB. După fixarea ligandului (un factor de creştere) la un receptor cuplat cu o protein kinază se produce activarea fosfolipazei C, legată şi ea la receptor,care converteşte apoi PIP2 (fosfatidilinositol bifosfat) în IP3 (inositol-trifosfat) şi diacilglicerol. Diacilglicerolul va activa protein kinaza C care la rândul ei activează NF-kB (prin degradarea IkB) care este translocat în nucleu şi activează transcripţia unor gene ţintă.

2.4 SELECTAREA PROMOTORILOR

Unele gene umane au doi sau mai mulţi promotori şi prin folosirea lor alternativă se pot produce diferite **isoforme** ale unei proteine, cu proprietăţi diferite: sinteza în ţesuturi diferite sau perioade diferite de dezvoltare, localizarea subcelulară sau capacitatea funcţională variată. Promotorii au "forţe" inegale, determinând tipul şi cantitatea de mesager transcris. Alegerea promotorilor nu se face la întâmplare ci prin acţiunea unor factori trans-regulatori, dintre care unii sunt specifici unui ţesut; acest fapt explică de ce unele ţesuturi exprimă un tip de mesager iar alte ţesuturi un alt tip (exemplu, α-amilaza; figura 4.30). Un exemplu frecvent citat de selecţie a promotorilor priveşte gena gigantă a distrofinei (2.4 Mb; 79 exoni) care are cel putin opt promotori; patru sunt situaţi în regiunea reglatoare 5' şi sunt specifici pentru cortexul cerebral, muşchi, cerebel, limfocite; se produc patru isoforme mari de distrofină, diferite prin capătul amino-terminal, datorită folosirii alternative a exonului 1. Alţi patru promotori sunt "interni", în structura zonei centrale a genei; transcripţia care începe de la nivelul acestor promotori va folosi numai o parte din exoni, rezultând isoforme mici de distrofină, prezente în rinichi, retină, celulele Schwann.

3. REGLAREA POSTTRANSCRIPŢIONALĂ.

Reglarea expresiei genelor se poate face şi prin mecanisme ce pot interveni post-transcripţional, modificând calitativ sau cantitativ formarea ARNm matur. Mai frecvent este vorba de matisarea sau poliadenilarea alternativă prin care o genă codifică mai multe proteine; mai rar se întâlneşte "editarea" ARN. Aceste mecanisme, deseori combinate, implică recunoaşterea unor secvenţe specifice din ARN de către proteine sau molecule de ARN reglatoare. Vom prezenta câteva din mecanismele mai cunoscute.

3.1. MATISAREA ALTERNATIVĂ SAU DIFERENŢIALĂ.

In procesul de maturare celula, printr-un mecanism "de alegere" (ce implică factori de transcripţie specifici de ţesut), elimină din ARNm precursor nu numai intronii, ci şi unii exoni codanţi; prin acest proces de matisare şi/sau poliadenilare alternativă, dintr-un transcript primar se formează mai multe molecule diferite de ARNm matur şi, prin translaţie, aceeaşi genă poate produce mai multe proteine diferite (figura 4.9). Uneori acestea au funcţii analoge (sunt *"isoforme"*), aşa cum este cazul genei mielinei, sau cu localizări tisulare sau intracelulare diferite (genele pentru imunoglobulina M, tropomiosina, receptorul hormonului de creştere, eritropoietina etc). Alteori se produc proteine complet diferite ca structură şi

funcţie; exemplul deja clasic este reprezentat de *gena calcitoninei* care, în celulele C din tiroidă produce *calcitonina* (un hormon ce asigură homeostazia C^{2+} circulant) iar în hipotalamus, un *peptid înrudit cu calcitonina* (CGRP), cu funcţii neuromodulatoare şi trofice. Fenomenul de selecţie a exonilor /matisare alternativă se întâlneşte la numeroase gene umane, explicând probabil că prin utilizarea a circa 35.000 de gene se pot sintetiza peste 100.000 de tipuri diferite de proteine. Pentru moment mecanismele de control al acestui proces nu se cunoaşte prea bine; intervin probabil regulatori ai matisării, proteine din familia SR (ce conţin un domeniu de fixare la ARN, alcătuit din serină-arginină) sau ribonucleoproteine nucleare heterogene (ARNhn). Specificitatea tisulară a acestui proces implică existenţa certă a unor molecule reglatoare diferite.

3.2. POLIADENILAREA ALTERNATIVĂ

Numeroase gene conţin la nivelul regiunii lor 3'UTR două sau mai multe semnale de poliadenilare şi, ca urmare, pot suferi procese de adenilare alternativă, cu specificitate tisulară. In alte cazuri, matisarea alternativă poate sa evidentieze un asemenea situs alternativ de adenilare (ca în cazul genei pentru calcitonina si CGRP mentionat anterior).

3.3. MODIFICAREA STRUCTURII PRIMARE A ARNm *(“RNA EDITING”).*

“Editarea” ARN este o formă rară de procesare post-translaţională a ARNm în care se produc modificări enzimatice specifice (substituţia, inserţia sau deleţia) unui nucleotid. La om au fost descrise: substituţia C → U (în gena pentru apolipoproteina B), substituţia A → I (Inositol) (în gena pentru receptorul glutamat B), substituţia U → C (în gena WT1). În felul acesta, acelaşi ARNm, în ţesuturi diferite, poate suferi o modificare a structurii primare producând proteine diferite prin lungimea lor. Spre exemplu, ARNm pentru apolipoproteina B produce în ficat **Apo-B100** şi în intestinul subţire o proteină mai mică, **Apo-B48**, care are o secvenţă de aminoacizi identică cu prima parte a Apo B-100; explicaţia acestei translaţii diferite este "simplă": în intestin, în codonul 2152 al ARNm, C este înlocuită cu U şi această modificare transformă codonul *sens* într-un codon *stop* şi opreşte translaţia ARNm la amino acidul 48.

3.4. MODIFICAREA STABILITĂŢII (DURATEI DE VIAŢĂ) A ARNm.

Intensitatea sintezei unei proteine depinde de concentraţia (cantitatea) ARNm corespunzător iar aceasta de durata lui de viaţă. De exemplu, ARNm produs de genele *c-MYC* sau *c-FOS* are o stabilitate anormal crescută şi determină o sinteză excesivă a proteinelor corespunzătoare, care intensifică proliferarea celulară. Creşterea stabilităţii este determinată de lungimea secvanţei poliadenilice din regiunea 3' . Un alt exemplu: sinteza de *histone* este intensă în timpul replicării ADN şi foarte scăzută în alte momente din viaţa celulei; acest fenomen este rezultatul modificării stabilităţii mesagerului pentru histone.

3.5. MODIFICAREA STOCAJULUI ARNm.

Stocajul post-transcripţional al moleculelor de ARNm în nucleu sau în citoplasmă şi distribuţia / disponibilitatea lor în momentul translaţiei este cert o modalitate de reglare a sintezei proteinelor. De exemplu, unii stimuli hormonali pot produce o intensificare rapidă a sintezei de proteine prin eliberarea ARNm deja stocat şi nu prin stimularea transcripţiei. Mecanismele prin care se *"decide şi se realizează"* stocarea anumitor mesageri nu sunt cunoscute.

3.6. INTERVENŢIA MOLECULELOR DE ARN INTERFERENT (ARNi)

Conform "dogmei centrale" a geneticii emisă in anii '50, fluxul informaţiei genetice se desfaşoara în directia ADN →ARN→proteine. De atunci, numeroase studii au dovedit că ARN este mai mult decat un simplu intermediar. Foarte recent au fost descrise însă câteva

clase de molecule ARN care ar putea modifica complet viziunea asupra acestor molecule. Conform unor date majoritatea moleculelor de ARN sunt "actori principali" într-o adevarată reţea moleculară implicată în reglarea expresiei genice. Printre asemenea clase noi de molecule ARN fac parte şi moleculele de ARNi (interferent). Ele sunt codificate de gene care pot avea diverse localizari cromosomice şi, odată transcrise, adoptă o conformaţie bicatenară. Sub acţiunea unor enzime (precum enzima *Dicer*) asemenea molecule de ARN bicatenar sunt fragmentate în piese scurte de 21-23 nucleotide, monocatenare, care se pot fixa pe baza de complementaritate la moleculele de ARNm. Atunci cand complementaritatea este perfectă, rezultatul poate fi impiedicarea translaţiei. Când legăturile pe bază de complementaritate sunt imperfecte efectul de inhibiţie a translaţiei poate fi redus sau nul. Prima genă din acesata clasă a fost identificată la om în anul 2000 (gena LET-7), iar analiza secvenţei sale a permis evidenţierea rapidă a mai multor gene identice la nivelul câtorva cromosomi.

4. REGLAREA TRANSLAŢIONALĂ.

4.1. REGLAREA TRANSLAŢIONALĂ CA RĂSPUNS LA ACŢIUNEA UNOR FACTORI EXTERNI.

Există cu certitudine o reglare translaţională a sintezei de proteine dar aceasta este puţin cunoscută. Probabil că unele mecanisme care produc acest tip de reglare influenţează stocajul mesagerilor, descris mai sus. Alte mecanisme implică recunoaşterea specifică a unor secvenţe *cis*-reglatoare din regiunile netranslate 5'UTR sau 3'UTR din ARNm, de către anumite proteine *trans*-reglatoare. Cel mai cunoscut exemplu de reglare translaţională este reglarea sintezei de feritină (proteină ce fixează şi transportă Fe^{2+}) în funcţie de nivelul fierului: creşterea nivelului de fier stimulează producţia de feritină şi invers. În regiunile 5'UTR şi 3'UTR se găseşte un element *cis-reglator* (în formă de "ac de păr"), numit IRE (de la Iron Response Element), pe care în absenţa Fe^{2+} se fixează o proteină ce opreşte temporar sinteza pe matriţa de ARN şi o protejează.

Un alt mecanism de reglarea a translaţiei implică *modularea activităţii unor factori de iniţiere ai translaţiei*, precum IF-2. IF-2 activat prin cuplarea sa cu GTP are rolul de a fixa prima moleculă de ARNt (metionil-ARNt) la nivelul ribosonului. Eliberarea sa ulterioara este insoţită de hidroliza GTP, cu transformarea consecutivă în GDP. Pentru a participa la un nou ciclu de initiere, este nevoie de schimbul GDP cu o noua moleculă de GTP. Acest nivel s-a dovedit a fi un punct critic de reglarea a translaţiei în o serie de celule. Fosforilarea IF-2 blocheaza GDP şi impiedică schimbul său cu GTP. Un tip de celula în care apare aceasta fosforilarea este reticulocitul, celula dedicată in principal sintezei hemoglobinei. Atunci când cantitatea de hem nu este suficienta, este activată o proteinkinază care induce fosforilarea IF-2 şi blochează astfel translaţia.

Au fost evidenţiate şi alte niveluri la care poate interveni reglarea translaţională, precum factorul de iniţiere IF-4E care se leagă la structura "cap" a ARNm.

4.2. CONTROLUL TRANSLATIONAL AL EXPRESIEI GENICE IN CURSUL DEZVOLTARII EMBRIONARE PRECOCE.

Lungimea cozii poliadenilice are un rol important în cursul dezvoltării embrionare precoce. Dupa fertilizare, nici o moleculă de ARNm nu este nou sintetizată până în stadiul de embrion cu 4-8 celule. În citoplasma ovocitului se gasesc numeroase molecule de ARNm de origine maternă care au o coada poliadenilică scurtă, de aproximativ 20 nucleotide. Aceste molecule sunt doar stocate, iar translaţia lor în cursul unor faze specifice ale dezvoltarii este consecinţa unor mecanisme care implică adiţia a noi adenine numai în cazul în care sunt identificate în amonte secvenţe poliuridilice specifice, precum şi interacţiunea acestei cozi cu o serie de proteine specifice.

4.3. LOCALIZAREA INTRACELULARĂ A ARNm.

Anumite secvenţe ale ARNm localizate la nivelul extremităţilor 5' si 3' (regiunile UTR) pot determina localizarea ţintită a acestor molecule la nivelul anumitor compartimente ale celulelor. Un asemenea mecanism pare a fi mai eficient decăt ţintirea ulterioară a proteinelor prin ataşarea unor secvenţe semnal: o singură moleculă de ARNm poate fi suficientă pentru sinteza a mii de molecule proteice în compartimentul celular dorit. Asemenea mecanisme au fost descrise în special în cazul unor celule cu dimensiuni considerabile, precum neuronii. De exemplu, moleculele de ARNm pentru proteina mielinica bazicăsunt transportate cu ajutorul kinezinei direct la nivelul prelungirilor oligodendrocitelor; ARNm pentru proteina *tau* sunt transportate direct la nivelul protiunilor proximale ale axonilor.

INTERNET

1. Dicţionar de biologie celulară: http://www.mlab.gla.ac.uk/~julian/Dict.html
2. Genetică medicală - University of Utah School of Medicine: http://medgen.genetics.utah.edu
3. Gene amprentate; http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting
4. Principii de genetică -Indiana U niversity Biotechnology: http://biotech.chem.indiana.edu
5. National Human Genome Research Institut: http://www.nhgri. nih.gov.
6. National Center for Biotechnology Information: : http://www.ncbi.nlm. nih.gov.
7. Whitehead Genome Institute at the Massachusetts Institute of Technology: http://www-genome.wi.mit.edu

Bibliografie specifică selectivă

1.Akashi H. *Gene expression and molecular evo*lution. Curr. Opin. Genet. Dev., 2001;11: 660-666.

2.Bass B.L. *RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA*. Annu. Rev. Biochem., 2002;71:817-846.

3.Bird, A. *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev., 2002;16: 6-21.

4.Brannan C.I., Bartolomei M.S. *Mechanisms of genomic imprinting.* Curr.Opin.Genet.Dev., 1999; 9:164-170

5.Day D.A., Tuite M.F. *Post-transcriptional gene regulatory mechanism in eukaryote: on overview.* J.Endocrinol., 1998; 157:361-371

6.Dever T.E. *Gene-specific regulation by general translation factors.* Cell 2002;108:545-556.

7.Hannon G.J. *RNA interference*. Nature, 2002;418:244-251.

8.Hartl F.U., Hayer-Hartl, M. *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science. 2002;295:1852-1858.

9.Hirose Y., Manley L. *RNA polymerase II and the integration of nuclear events*. Genes Develop., 2000;14:1415-1429.

10.Jenuwein T., Allis C.D. *Translating the histone code*. Science. 2001;293:1074-1780.

11.Jones P.A. *The DNA methylation paradox.* Trends Genet., 1999;15:34-37

12.Kolman J.A., Stemmer, W.P. *Directed evolution of proteins by exon shuffling*. Nat. Biotechnol., 2001;19:423-428.

13.K;einjan D.J., van Heyningen V. *Position effect in human genetic disease.* Hum.Mol.Genet., 1998;7:1611-1618

14.Li E. *Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development*. Nat. Rev. Genet., (2002) 3, 662-673.

15.Lyon M.F. *X-chromosome inactivation.* Curr.Biol., 1999; 9:R235-237

16.Paulsen M., Ferguson-Smith A.C. *DNA methylation in genomic imprinting , development and desease.* J. Pathol., 2001;195: 97-110.

17.Roberts G.C., Smith C.W. *Alternative splicing: combinatorial output from the genome*. Curr. Opin. Chem. Biol., 2002; 6:375-383.
18.Tilgman S.M. *The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development*. Cell, 1999; 96:185-193.

CAPITOLUL 5

TRANSMITEREA INFORMAŢIEI EREDITARE

Informaţia ereditară, necesară pentru sinteza diferitelor proteine şi realizarea caracterelor fenotipice, se transmite din generaţie în generaţie, în două etape (vezi figura 1.1):

- biosinteza unor noi molecule de ADN identice cu molecula iniţială – prin *replicare semiconservativă* – care va conduce la dublarea cantităţii de ADN;
- distribuţia totală, egală şi precisă a materialului genetic dublat, prin *diviziune celulară.*

Aceste procese, riguros controlate, se realizează de obicei cu mare *fidelitate* (exactitate) asigurând astfel *stabilitatea* proceselor ereditare. Evident, ele pot suferi şi *erori* (de replicare sau de distribuţie) care, în absenţa unor mijloace eficace de reparare şi eliminare a erorilor, pot avea consecinţe importante la descendenţi, producând boli.

Transmiterea informaţiei şi caracterelor ereditare în succesiunea generaţiilor de celule şi organisme eucariote este supusă unor legi obiective şi universale.

A. REPLICAREA ADN.

Descriind modelul structurii ADN, alcătuit din două catene polinucleotidice, antiparalele (cu polaritate inversă), legate între ele (prin punţi de hidrogen) în mod complementar (A-T; G-C), Watson şi Crick au intuit de la început că modelul propus de ei *explică mecanismul de copiere a informaţiei genetice*: fiecare catenă serveşte drept matriţă pentru formarea unei catene noi.

Schematic, dubla spirală a ADN se *separă* în cele două catene componente (asemenea deschiderii unui fermoar), formând o structură în formă de Y numită *"furcă de replicare"*. Fiecare catenă serveşte apoi ca *matriţă* sau tipar pentru aranjarea complementară (A-T, G-C) şi secvenţială (în direcţia 5'→3') a deoxiribonucleotidelor activate, care vor fi polimerizate sub acţiunea ADN polimerazei (figura 5.1.). Astfel, o moleculă bicatenară de ADN va forma două molecule noi, *identice* între ele precum şi cu molecula "parentală", fiecare formată dintr-o catenă *"veche"* şi o catenă *"nou sintetizată";* de aceea procesul de sinteză al ADN a fost numit **replicare semiconservativă.** În felul acesta informaţia genetică a fost transmisă întocmai, în succesiunea generaţiilor de molecule.

Experimental, s-a dovedit[1] că procesul real al replicării genomului este concordant cu această ipoteză dar prezintă un nivel de complexitate care a evoluat de la organismele inferioare la cele superioare. Cele mai multe studii ale mecanismului de replicare a ADN au fost efectuate la procariote, din cauza facilităţilor experimentale, dar *mecanismul de bază este similar şi la eucariote*. Cu toate acestea replicarea ADN în celulele animale este un proces foarte complex datorită *mărimii* enorme a genomului, fragmentării sale în cromosomi, asocierii cu proteine histonice în *nucleosomi* şi *compactării*, prin spiralizare, în fibre de cromatină. De aceea, replicarea ADN implică numeroase interacţiuni proteină-proteină şi proteine-ADN şi este precis reglată temporal şi spaţial, în concordanţă cu fazele ciclului celular. Pentru a putea discuta aceste "particularităţi" de complexitate, decisive pentru acurateţea transmiterii informaţiei ereditare, vom prezenta mai întâi "maşinăria" de sinteză şi mecanismul molecular "de bază" al replicării ADN.

1. PROTEINELE IMPLICATE ÎN REPLICAREA ADN

[1] Demonstrarea experimentală a replicării semiconservativea fost realizată, cu eleganţă şi precizie, prin încorporarea unor nucleotide marcate radioactiv (Meselson şi Sthal,1957; Taylor, 1957) sau a bromodeoxiuridinei în moleculele de ADN care se sintetizează (Zaharov, 1972; Latt, 1973)

Replicarea ADN se face sub acţiunea precisă şi rapidă a unui *complex multiproteic* (numit şi *sintesom*), o veritabilă "maşină de replicare", care se mişcă în lungul ADN (figura 5.2). Fiecare piesă componentă are funcţii precise.

ADN polimerazele. La om au fost identificate cinci tipuri de ADN polimeraze, denumite α, β, γ, δ şi ε; în replicarea ADN nuclear sunt implicate *ADN polimeraza δ, enzima replicativă majoră*, şi ADN polimeraza α; ADN polimeraza γ realizează replicarea ADN mitocondrial iar ADN polimerazele β şi ε participă la repararea ADN.

ADN polimerazele folosesc catena matriţă şi orientarea legăturilor de hidrogen ale purinelor şi pirimidinelor pentru a "stabili" care deoxiribonucleotid va fi adăugat în catena nouă. ADN polimerazele catalizează formarea legăturilor fosfodiesterice între deoxiribonucleotidele adiacente care vor forma catena de ADN. În legătură cu activitatea ADN polimerazelor sunt important de subliniat două caracteristici generale:

- toate ADN polimerazele sintetizează ADN *numai în direcţia 5'→3'*, deci fiecare nou nucleotid va fi adăugat la gruparea 3'OH a nucleotidului deja încorporat într-o catenă polinucleotidică, de regulă catena în curs de sinteză;
- ADN polimeraza *"nu ştie" să înceapă sinteza* unei catene ci numai să o alungească, adăugând un nucleotid la extremitatea 3'OH a unui acid nucleic (indiferent dacă este ADN sau ARN) care este legat complementar prin intermediul punţilor de hidrogen la catena matriţă; de aceea sinteza unei catene noi de ADN începe de fapt cu sinteza unei *amorse de ARN* (!) (în engleză *primer*).

ADN helicazele *desfac* dublu helixul de ADN (folosind energia furnizată de ATP) şi "eliberează" monocatenele ce vor funcţiona ca matriţe pentru replicare; ele acţionează în puncte specifice, precis localizate, numite şi *origini ale replicării*, şi apoi asigură înaintarea furcii de replicare, prin ruperea legăturilor de hidrogen, debobinarea şi deschiderea moleculei de ADN, care devine accesibilă proteinelor care iniţiază replicarea.

ADN topoisomerazele I şi II *despiralizează* helixul ADN şi eliberează tensiunea din molecula de ADN, acumulată prin debobinarea sa de către helicaze (care produc o *superînrulare a ADN* în aval de locul de acţiune). Topoisomerazele secţionează una sau ambele catene ale ADN (la nivelul axului fosfodiesteric), le derulează (relaxând molecula de ADN, prea strâns înfăşurată) şi apoi resudează breşa din fiecare catenă.

> Există două tipuri de asemenea enzime: topoizomerazele I determină secţionarea unei singure catene ADN, iar topoizomeraza tip II determină rupturi ADN simultan la nivelul celor doua catene. In plus, topoizomeraza II pare a interveni şi în alte procese celulare precum condensarea cromosomilor în cursul mitozei şi separarea anafazică a cromatidelor surori.

Proteinele de replicare A (RPA) numite şi proteine SSB (de la *single-strand binding proteins*) *menţin separate* cele două catene desfăcute de helicaze, prin fixare la monocatene şi "mascarea" perechilor de baze, care au tendinţa naturală de a se reuni, prin refacerea punţilor de hidrogen; RPA împiedică reîmperecherea bazelor.

Complexul ADN primază – ADNpolimerază α este implicat în sinteza *amorselor* şi replicarea catenei "întârziate" a ADN. Sub acţiunea ADN primazei se sintetizează amorse scurte (3-10 nucleotide) de ARN la care *ADN polimeraza α* adaugă, la capătul 3' terminal, circa 30 de deoxiribonucleotide. Apoi complexul ADN primază-ADN polimeraza α este îndepărtat şi ADN polimeraza δ "preia ştafeta" continuând sinteza lanţului de deoxiribonucleotide început. Amorsele ARN vor fi distruse prin hidroliză enzimatică şi înlocuite cu ADN.

Proteinele de replicare C (RPC) recunosc specific şi se leagă la joncţiunea dintre primer si matriţă, fiind responsabile de medierea şi stabilizarea interacţiunii ADN polimerazei cu matriţa ADN.

PCNA (de la *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) se leagă în imediata vecinătate a proteinelor RPC şi, împreună, sunt principalele proteine asociate ADN polimerazei. PCNA se organizează sub forma unor dimeri care au configuraţia spaţială a unui inel ce lunecă de-a lungul matriţei ADN şi permit încorporarea neîntreruptă a mii de nucleotide în catena ADN nou sintetizată. Blocarea PCNA (de exemplu, prin proteina *p21*) opreşte replicarea ADN.

Ribonucleaza H1 (RNaza H1) îndepărtează amorsele ARN[2] folosite de ADN polimeraze pentru iniţierea replicării; lacuna rezultată este completată, refăcută, de ADN polimerază δ iar refacerea continuităţii catenei este realizată prin sudarea capetelor, de către o **ADN ligază.**

2. MECANISMUL MOLECULAR AL REPLICĂRII ADN.

Procesul de replicare începe în "puncte" definite ale genomului numit **origini de replicare** ("**ori**") şi de aici progresează *în ambele direcţii*, până ce ADN este complet duplicat. La nivelul originilor replicării se fixează pe ADN *proteinele de iniţiere* ale replicării – care formează **compexele prereplicative (pre-RC) -** de care se leagă apoi celelalte enzime ale "aparatului de replicare": topoisomerazele, helicazele, primazele, ADN polimerazele.

La nivelul originilor replicarii, în cursul fazei G1 a ciclului celular, are loc formarea asa-numitelor **complexe prereplicative** (pre-RC) prin asamblarea secvenţială a unor proteine (ORC, Cdc6, Cdt1 si Mcm2-7). Odată format, complexul va fi activat prin intervenţia unor kinaze ciclin-dependente care declanşează tranziţia către replicarea ADN. Aceasta tranziţie implică asamblarea succesivă a unor factori de replicare adiţionali (precum Mcm10, CDK, DDK, Cdc45, Sld3 şi proteinele de replicare A) care facilitează despiralizarea ADN la nivelul originilor replicării şi culminează cu asocierea ADN polimerazelor la ADN-ul despiralizat.

Dubla elice este apoi despiralizată sub acţiunea *topoisomerazelor* iar catenele sunt separate temporar de către *ADN helicaze*, într-o regiune localizată, formând o structură în formă de Y – *furca de replicare*. Pentru a menţine catenele desfăcute, pe fiecare catenă "eliberată" se fixează *proteinele RPA (sau SSB)*, care împiedică re-împerecherea bazelor complementare şi refacerea spontană a dublului-helix (figura 5.2.).

Pe cele două catene "matriţă" are loc, în prezenţa ADN polimerazei δ, *aranjarea secvenţială şi complementară* a deoxiribonucleotidelor *activate* în prealabil (deci sub formă de nucleosid trifostaţi), pentru a aduce energia necesară reacţiei de polimerizare.

Polimerizarea nucleotidelor se face diferit pe cele două catene matriţă, datorită a două elemente caracteristice, menţionate anterior:

- cele două catene ale ADN sunt *antiparalele;*
- *ADN polimeraza* nu poate iniţia sinteza de novo a unui lanţ polinucleotidic prin *legarea* a două mononucleotide; ea este capabila doar sa inducă adiţia unui nucleotit la capatul 3'OH al unui lanţ polinucleotidic preexistent; de aceea, declanşarea replicării ADN necesită utilizarea unor *amorse* de tip ARN ("primer") - sintetizate sub acţiunea *primazei*; sinteza se face aşadar numai în direcţia 5' → 3' iar ADN polimeraza "ştie" numai să alungească catena în curs de sinteză.

Aceste două caracteristici determină *"o asimetrie"* în procesul de replicare: pe catena matriţă 5'→3' sinteza catenei noi este *continuă* şi rapidă ("leading strand" sau catenă avansată), pe măsura desfacerii celor două catene, iar pe catena 3'→5' sinteza ADN este *discontinuă*, sub forma unor secvenţe scurte (100-1000 nucleotide) de ADN numite şi*"piese Okazaki"*[3], fiind mult mai lentă ("lagging strand" sau catenă întârziată) **(**figura 5.3)**.** Ulterior amorsa este distrusă prin hidroliză şi înlocuită cu secvenţe de tip ADN, sub acţiunea ADN polimerazei δ iar fragmentele sunt unite de către o *ligază*. Pentru catena avansată amorsa este necesară numai la începutul replicării; în schimb pentru catena întârziată sinteza fiecărui fragment Okazaki necesită o amorsă.

3. PARTICULARITĂŢILE REPLICĂRII ADN LA EUCARIOTE.

Mecanismele de replicare a ADN la eucariote sunt în general asemănătoare celor de la procariote. Apar totuşi anumite particularităţi determinate de: mărimea enormă a genomului, asocierea ADN cu proteinele în nucleosomi şi fibre de cromatină şi momentul replicării în ciclul celular (faza S). ADN nuclear este localizat în mai mulţi cromosomi, fiecare cu o structură nucleoproteică complexă. Acest fapt implică iniţierea replicării în mai multe puncte de origine, sinteza concomitentă a proteinelor histonice necesare menţinerii organizării cromosomilor, reglarea precisă temporo-spaţială a replicării în unităţile de replicare sau repliconi. Sinteza ADN nuclear

[2] RNaza H1 degradează specific hibridul format de amorsa ARN şi ADN (numele H provine de la *Hybrid*)

[3] Piesele Okazaki se vor sintetiza în direcţia 5'→ 3', care va fi în direcţia opusă furcii de replicare.

depinde de multiple proteine enzimatice sintetizate în citoplasmă precum şi de transmiterea stimulilor extracelulari care declanşează replicarea. Există o reglare a sintezei ADN dependentă de ciclul celular.

3.1. ORIGINILE REPLICĂRII ŞI REPLICONII.

Datorită lungimii mari a genomului, asocierii cu proteine în nucleosomi şi organizării în fibre de cromatină, viteza de replicare a ADN la eucariote este redusă (circa 50 nucleotide pe secundă comparativ cu 500 nucleotide pe secundă la procariote, unde ADN este "gol", neasociat cu proteine). ADN trebuie însă să fie replicat integral în circa 8 ore; pentru a echilibra această situaţie "conflictuală", replicarea ADN la eucariote *debuteză în mai multe puncte de origine*, ce corespund unor mici unităţi de replicare numite **repliconi**. Replicarea progresează bidirecţional pentru fiecare replicon (figura 5.3) şi, după ce se termină, repliconii fuzionează treptat până ce întreagul cromosom este duplicat (figura 5.4). Fiecare cromosom uman are puncte de origine multiple, situate la 150-200 kb iar întregul genom posedă circa 30.000 de puncte de origine**.**

Punctele de origine a replicării sunt reprezentate de secvenţe specifice de ADN (de circa 3000 nucleotide) care semnalează startul replicării şi permit asamblarea "aparatului de replicare". Aceste secvenţe nucleotidice specifice, în care se începe replicarea, conţin două categorii de elemente: elemente de tip A, putenic conservate la toate eucariotele, reprezentate de **secvenţele de replicare autonomă** sau **ARS** (de la *autonomously replicating sequence*) bogate în repetiţii AT[4] şi elemente de tip B, mai puţin conservate.

3.2. APARATUL DE REPLICARE.

La eucariote există o "maşină" de replicare ce conţine toate elementele menţionate anterior (vezi A.1). De subliniat că ADN polimeraza α acţionează pe catena întârziată ("*lagging*") şi ADN polimeraza δ atât pe catena avansată ("*leading*") cât şi pe cea întârziată. În reglarea activităţii ADN polimerazelor sunt implicate: *PCNA* sau antigenul nuclear de proliferare celulară şi factorul de replicare C (*RF-C*), ambele cu roluri importante în controlul pornirii sau opririi replicării.

3.3.REPLICAREA ADN ŞI NUCLEOSOMII.

ADN-UL eucariotelor este asociat cu proteine histonice formând nucleosomii, structuri compacte în care ADN se înfăşoară (de două ori) în jurul unui octamer de histone **(**vezi capitolul 2.D.2.3). Se pune firesc întrebarea: cum se comportă nucleosomii înainte şi după replicare? Se presupune că atunci când furca de replicare ajunge în dreptul nucleosomului, ADN se derulează şi miezul histonic se desface în două jumătăţi care rămân ataşate la una din cele două molecule de ADN formate prin replicare**;** ele vor reface ulterior nucleosomul original. Pe cealaltă moleculă de ADN se vor constitui însă noi nucleosomi. Acest model este ipotetic dar s-a demonstrat cu certitudine că o dată cu sinteza ADN are loc în nucleu o sinteză importantă de histone necesare constituirii de nucleosomi noi.

3.4. REPLICAREA ADN ARE LOC ÎN FAZA S A CICLULUI CELULAR.

Celulele umane realizează procesul de replicare într-o perioadă particulară a ciclului lor de viaţă, faza S. Toate celulele ce se divid trec prin acest *ciclu celular* alcătuit din patru faze G1, S, G2 – ce corespund interfazei - şi M sau faza mitotică.

In celulele de mamifere faza S durează circa 8 ore (pentru un ciclu celular de 24 de ore); este un timp scurt pentru replicarea întregului genom uman diplod de peste 6 miliarde de pb. La această constrângere temporală se adaugă obligaţia ca replicarea ADN să fie foarte precisă deoarece orice eroare de plasare a nucleotidelor în catena nou sintetizată produce mutaţii. Celula are mijloacele

[4] Repetiţiile multiple ale dinucleotidului AT sunt asociate frecvent cu regiunile de ataşare la "axul "- intern al cromosomului – ("*scaffold*") şi codifică elemente specifice necesare destabilizării structurii helicale a ADN; de aceea sunt numite şi *"DNA unwiding elemnts" (DUEs)*

necesare pentru a se asigura că întregul genom este integral şi corect replicat în cursul fazei S. La aceasta se adaugă mecanisme multiple de identificarea şi corecţie a erorilor

Reglarea replicării ADN - se realizează prin interacţiuni coordonate între diferite proteine: ciclinele, CDK, inhibitoriii CDK , precum şi anumiţi factori de transcripţie (care activează punctele de origine ale replicării)(vezi 5.B.1):

- Ciclinele[5] D şi E facilitează trecerea G1/S iar ciclina A asigură progresia prin faza S;
- CDK4 este o protein kinază activatoare;
- Factorii de transcripţie: **RLF** (inclus în complexul de pre-replicare) - activează punctele de origine a replicării şi împiedică re-replicarea în cursul aceluiaşi ciclu iar **E2F** stimulează expresia genelor necesare intrării în faza S;
- Inhibitorii kinazelor dependente de cicline sau CKI (proteinele P21, P27 ş.a.) formează al doilea nivel de reglare al intrării şi progresii celulelor prin faza S; ei blochează aceste procese (inhibând complexele CDK-cicline şi PCNA) fie atunci când apar leziuni în ADN fie în cursul diferenţierii terminale a unui ţesut (însoţită de pierderea capacităţii de replicare şi diviziune).

Unităţile de replicare (ce includ 20-80 repliconi) nu sunt activate concomitent şi la întâmplare ci *asincron şi într-o anumită ordine*, în funcţie de structura cromatinei în care ele se găsesc. Cromatina puternic condensată (heterocromatina) este replicată tardiv, la sfârşitul fazei S, în timp ce eucromatina, mai decondensată, se replică precoce, la începutul fazei S. Deci regiunile din genom în care cromatina este mai puţin condensată şi deci mai accesibilă maşinăriei de replicare sunt replicate mai precoce; acestea sunt de regulă benzile R (bogate în G-C) regiuni de ADN care conţin în special genele "domestice" (active în toate celulele). Regiunile din cromosomi care sunt replicate tardiv coincid cu benzile G, bogate în A-T.

In mod normal, în faza S întregul genom este replicat *o singură dată*. Deoarece replicarea ADN este asincronă există riscul teoretic ca unele regiuni să fie replicate repetat. Acest lucru nu se întâmplă deoarece o serie de factori inhibitori se fixează pe cromatina replicată şi nu permit replicarea ei repetată, până ce celula nu trece prin mitoză. Aceşti factori sunt îndepărtaţi prin diviziune şi celulele rezultate pot începe un nou ciclu, cu faza S, în care se produce o nouă replicare.

3.5. REPLICAREA TELOMERELOR

Telomerele sunt structuri cromatiniene *specializate,* situate la capetele cromosomilor eucariotelor, care asigură stabilitatea cromosomilor şi împiedică unirea cromosomilor prin capetele lor.

Telomerele cromosomilor umani, alcãtuite din *ADN şi proteine,* au o structurã *identicã* la specii diferite şi *puternic conservatã* în cursul evoluţiei (acest fapt atestã importanţa lor funcţionalã deosebitã). Telomerele sunt formate din elemente repetitive hexanucleotidice (la om TTAGGG) dispuse in tandem, care se extind pe o lungime variabila de 5-20 kb, in functie de tesut si de varsta individului**.** Datoritã particularitãţilor de replicare ale capetelor ADN liniar din cromosomi (ce implicã folosirea unor amorse degradabile pentru iniţierea replicării), la fiecare *capãt 5' al catenelor nou sintetizate* de ADN rămâne o mică regiune (corespunzătoare ultimei amorse) care nu este replicată (figura 5.3.b). Extremitatea moleculelor de ADN ramâne cu o prelungire monocatenară 3', protuberantă şi instabilă. Aceasta se pliazã (spre înapoi) şi formeazã o structurã *"în ac de pãr",* care stabilizeazã ADN[6]; efectul stabilizant este favorizat şi prin asocierea, la acest nivel, a unor proteine speciale (TRF1 Şi TRF2).

Un fenomen caracteristic telomerelor este *pierderea inexorabilã a unor secvenţe de ADN la fiecare replicare* (diviziune celularã). Deoarece, la capãtul 5' al catenelor de ADN nou sintetizate **replicarea este incompletã** şi la fiecare ciclu celular se pierd 25-200 pb. Aceasta duce la *scurtarea progresivã a telomerelor* şi, dupã un numãr de replicãri, la *oprirea replicãrii şi diviziunii* (în Go, prin acţiunea proteinelor P53). Telomerele ar fi *"cãlcâiul lui Achile al dublei spirale a ADN"* (Olovnicov, 1993). Datoritã eroziunii permanente a telomerelor, celulele umane au numãr limitat de

[5] Ciclinele D, E şi A împreună cu CDK4 alcătuiesc **SPF** (*S-phase promoting factor*) care controlează faza S

[6] După Greider, 1999, se formează chiar o structură triplu catenară, asemănătoare cu bucla D de la ADNmitocondrial

diviziuni atât *in vivo*[7] cât şi *in vitro.* Se poate spune cã lungimea telomerelor este un *indicator al istoriei replicative* a celulelor şi poate fi consideratã un fel de *"ceas molecular"* care aratã potenţialul replicativ *restant* al celulelor normale; când telomerele ating o *lungime minimã criticã* celula încetează sã se dividã şi *"ceasul"* se opreşte.

Pierderea secvenţelor telomerice poate fi compensatã prin adiţia *de novo* a secvenţelor TTAGGG la capătul 3' al unei catene de ADN, de către enzima **telomerazã**, care stabilizează telomerele şi previne scurtarea lor. Telomeraza este o ribo-nucleoproteinã ce conţine o scurtã secvenţã de ARN, complementarã repetiţiilor telomerice (la om aceastã secvenţã este: 3'-CCCAAUCCC-5') ce funcţionează ca *matriţă internă* (figura 5.5). Telomeraza este un tip neobişnuit de revers transcriptazã (ADN polimerazã ARN dependentã) care adaugã la capătul 3'(bogat în G) noi secvenţe de nucleotide telomerice, fãrã sã necesite o matriţã exogenã. Sinteza celeilalte catene complementare a telomerului , bogată în C, implică o amorsă+ADN polimeraza α, ce foloseşte ca matriţă catena telomericã bogată în C, care a fost deja sintetizată de telomeraza.

Telomeraza este exprimatã în celulele germinale[8] tinere (din gonade), în blastocist şi cele mai multe ţesuturi embrio-fetale în sãptãmânile 16-20 ale dezvoltãrii; Activitatea telomerazei *scade progresiv* în viaţa fetalã şi *dispare postnatal,* în aproape toate celulele somatice normale; excepţie fac celulele stem din mãduva oaselor. Dispariţia activitãţii telomerazice în celulele somatice dupã naştere determinã *scurtarea progresivã a telomerelor (dupã fiecare divizune), odatã cu vârsta*. Când se atinge (la o vârstã înaintatã) o lungime criticã minimã *diviziunea celularã se opreşte* şi începe **senescenţa**. Pierderea telomerelor generează de asemenea *instabilitatea* genomicã şi creşterea frecvenţei *rearanjamentelor* cromosomice.

Telomeraza poate fi însã *reactivatã* în procesele inflamatorii dar mai ales în celulele canceroase. Acest lucru opreşte scurtarea telomerelor, creşte stabilitatea lor (prin adãugarea secvenţelor repetitive hexanucleotidice la capetele cromosomilor) şi astfel *stimulează proliferarea celularã*. Componenta catalitică a telomerazei, numită TERT, a fost localizată pe cromosomul 5p15.33 si a fost clonată în 1999. Componenta ribosomală numită TERC este codificată de o genă scurtă (451 nucleotide) care a fost localizată pe cromosomul 3q21-q28.

Recent, mutaţii ale genei TERC au fost identificate la pacienţi care prezintă o formă transmisă autosomal dominant de *discheratoza congenitală.* La aceşti pacienţi s-a documentat o lungime semnificativ mai scurtă a telomerelor. Mutaţii ale TERC au fost identificate de asemeni şi la unii pacienţi cu anemie aplastică idiopatică. Și în aceste cazuri lungimea telomerelor a fost gasită a fi redusă.

În ultimii ani se acordă un interes doesebit studiului corelaţiei dintre scurtarea telomerelor, senescenţa celularã, expresia telomerazei şi cancerelor umane. A apărut ceea ce se cheamă **"ipoteza telomer - telomerazã a îmbãtrânirii şi cancerului"** (Caseta 5.1).

Caseta 5.1

Telomerele si senescenţã.

"Ipoteza telomericã a senescenţei" (Harley, 1991) se bazează pe faptul cã în celulele somatice normale lungimea secvenţelor telomerice repetitive *scade cu vârsta* (de la 20.000 pb la embrion, la circa 6000 pb la vârstnic). Acest fenomen a fost demonstrat atât *in vitro* cât şi *in vivo*. In consecinţă, lungimea telomerelor poate fi consideratã un indicator ce mãsoarã *capacitatea proliferativã restantã* a celulei iar scurtarea progresivã a telomerelor (prin replicarea incompletã) - un **biomarker al îmbãtrânirii**. Astfel, în *sindroamele de îmbãtrânire acceleratã* - în sindromul Werner, sindromul Hutchinson-Gilford şi alte stări progeroide - telomerele sunt mult mai mici decât la persoane normale de aceeaşi vârstã.

Nu credem cã relaţia dintre scurtarea telomerelor şi senescenţã este mecanismul fundamental (şi nici decum unic) al îmbãtrânirii. Dar ipoteza este plauzibilã, ca o componentã a îmbãtrânirii celulare, şi studiul ei poate aduce multe surprize şi, de ce nu, acţiuni benefice. De ex., (1) *încetinirea ratei de scurtare a telomerelor* în celulele şi ţesuturile normale ar putea afecta profund vârsta debutului şi severitatea multor boli asociate cu vârsta; (2) *alungirea ex vivo a telomerelor* în limfocitele T, fibroblastele dermice sau celulele

[7] la om, celulele somatice pot produce prin diviziune *maximum 80 de generaţii celulare* (ipoteza Hayflick); (excepţie fac însã celulele stem pluripotente)

[8]Datoritã numărului mare de diviziuni ce au loc în spermatogenezã, absenţa telomerazei ar duce la extincţia rapidă a acestei preţioase populaţii celulare .

endoteliale ar putea avea un impact major asupra răspunsului imun în HIV, vindecarea rănilor şi poate în bolile cardiovasculare

Telomerele, telomeraza şi boala canceroasă.

In mod cert telomerele asigură *protecţia şi stabilitatea cromosomilor*. Pierderea telomerelor produce rearanjamente cromosomice sau poate duce la *pierderea cromosomului* respectiv din celulă. Aceasta ar putea explica pierderea heterozigozităţii locilor pentru genele supresoare ale creşterii tumorale, un mecanism fundamental în cancerogeneză. In plus, s-a constatat că în cancer se produce o **reactivarea a telomerazei**, care stabilizează lungimea telomerelor, adăugând secvenţele hexamerice specifice, şi *celulele încep să se dividă activ*. Acest fenomen este, foarte probabil, implicat în *imortalizarea celulară*[9] *şi/sau creşterea continuă a tumorilor* (favorizând poate şi metastazarea). Desigur relaţia dintre reactivarea telomerazei şi cancer nu este simplă. *In primul rând* existenţa reală a unor tumori telomerazo-negative arată însă că activarea telomerazei nu este obligatorie pentru formarea / creşterea tumorilor[10]; există foarte probabil şi alte mecanisme de imortalizare celulară, independente de telomerază. *In al doilea rând,* producerea cancerului necesită şi alte mecanisme celulare, alte mutaţii adiţionale care să determine invazia şi metastazarea. In *al treilea rând* nu se cunosc mecanismele moleculare de reactivare a telomerazei. Un exemplu este gena c-MYC care a fost identificata ca reglator esential al activitatii TERT. c-MYC interactioneaza cu promotorul genei TERT, iar mutatiile cu castig de functie ale genei c-MYC pot explica cel putin partial reactivarea activitatii telomerazice in unele cancere. Se presupune că ar exista gene implicate în represia normală a telomerazei postnatal, care prin mutaţie ar produce reactivarea enzimei. Nu se cunoaşte încă rolul telomerelor şi telomerazei în transformarea de la tumori benigne la tumori maligne.

Cu aceste precizări şi păstrând un entuziasm ponderat se poate afirma că determinarea activităţii telomerazei este un marker pentru diagnosticul precoce al cancerului şi pentru evaluarea prognosticului iar folosirea unor inhibitori ai telomerazei (în special molecule antisens[11] complementare faţă de componenta ARN a telomerazei umane) ar putea deveni un tratament eficace contra cancerelor. In concluzie, *"telomeraza îndeplineşte multe din criteriile pentru o metodă ideală în terapia cancerului şi deşi există încă multe întrebări fără răspuns despre ipoteza telomerică, optimismul pare justificat"* (Shay et al., 1996).

Cert este că ipoteza telomer - telomerază a îmbătrânirii şi cancerului, chiar dacă nu pare perfectă este seducătoare şi în anii care vin vom mai auzi cu siguranţă multe lucruri noi, care sperăm să fie cât mai benefice practicii medicale în gerontologie şi oncologie.

3.6.FIDELITATEA REPLICĂRII ADN.

Acurateţea replicării ADN este critică pentru transmiterea informaţiei ereditare în succesiunea celulelor şi organismelor. De aceea, organismul uman posedă numeroase mecanisme care determină ca rata erorilor de împerechere (*"mismatch"*) apărute în cursul procesului de replicare să fie extrem de redusă, de circa o încorporare greşită la $10^9 – 10^{10}$ nucleotide.

În momentul în care cele două catene ADN sunt separate, nucleotidele activate se aranjează "spontan" şi pe bază de complementaritate pe întreaga porţiune a matriţei de ADN astfel expusă. Stoichiometria reacţiei de aşezare pe bază de complementaritate permite împerecheri greşite (în special unele precum G-T) cu o probabilitate de 1 la 10.000. Gradul crescut de fidelitate al replicării este rezultatul unor activităţi specifice ale ADN polimerazelor.

Un prim mecanism prin care ADN polimerazele ajută la cresterea fidelităţii replicarii este prin inserţia corectă a bazelor în catena ADN nou sintetizată. ADN polimerazele nu catalizează încorporarea pasivă a oricărui nucleotid care este deja legat prin punţi de hidrogen la catena matriţă, ci discriminează activ împotriva unor împerecheri greşite probabil pe baza de conformaţie tridimensională. Recunoaşterea erorii se face pe seama *distorsiunii* pe care o produce în diametrul constant de 2nm al moleculei de ADN împerecherea greşită a două nucleotide cu purină (molecule mari) sau două nucleotide cu pirimidină (molecule mici). Această distorsiune acţionează ca semnal pentru îndepărtare noii baze inserate greşit. Mecansimul creşte acurateţea replicării de aproximativ 100 de ori, reducând rata aşteptată a erorilor de la 10^{-4} la aproximativ 10^{-6}.

[9]De aceea dispariţia postnatală a activităţii telomerazei ar putea fi consideratã un "mecanism de prevenire" a proliferării excesive şi anormale a celulelor somatice.

[10]Unele cancere care necesitã puţine mutaţii pentru a deveni maligne şi deci nu implicã decât un număr mic de diviziuni celulare ar putea fi telomeraz negative

[11]Oligonucleotide modificate de tipul "peptide nucleic acids (PNAs) (7) în care deoxiriboza a fost înlocuitã de N-glicinã

Un alt mecanism major responsabil pentru acurateţea replicării ADN este activitatea de *autocorecţie* (sau editare de la *proofreading*) a ADN polimerazelor. Aceasta este rezultatul capacităţii exonucleazice 3' – 5' care acţionează în sensul opus sintezei ADN şi înlătură nucleotidele încorporate greşit în catena nouă. Asemenea activitate exonucleazică 3' – 5' a fost documentată pentru ADN polimerazele delta si epsilon şi permite creşterea acurateţei replicării ADN de circa 100-1000 ori.

În sfârşit, puţinele erori de împerechere care apar totuşi în ciuda intervenţiei mecanismelor mai sus amintite vor fi ţinta unor *mecanisme de reparare a ADN* (în principal sistemul de reparare al erorilor de împerechere) care vor fi discutate în capitolul 6. Lipsa corectării lor va conduce la apariţia mutaţiilor, prin replicari celulare ulterioare. De exemplu, dacă în dreptul A de pe matriţă se va plasa eronat C, în loc de T, la următoarea replicare se va produce substituţia perechii de baze A-T cu C-G.

Cert este că integritatea structurală a ADN este extrem de importantă pentru supravieţuire şi toate celulele vii au mecanisme evoluate de reparare a leziunilor ADN. Această paradigmă a fost tragic confirmată prin descoperirea unor *sindroame de predispoziţie la cancer* care se produc prin mutaţii ale genelor ce codifică proteinele implicate în reparare. Astfel de mutaţii ale genelor (numite firesc gene *mutator*) determină o creştere de peste 100 de ori a ratei mutaţiilor şi produc o predispoziţie individuală la cancer, în special cancer de colon.

B. TRANSMITEREA INFORMAŢIEI GENETICE DE LA O CELULĂ LA CELULELE „FIICE”

În celulele somatice, materialul genetic dublat în interfază, se distribuie în mod *egal şi total* celulelor fiice, prin procesul de diviziune mitotică. Rezultă două celule noi („fiice”), identice din punct de vedere genetic, atât între ele, cât şi cu celula („mamă”) din care provin. Procesele prin care o celulă îşi replică materialul genetic, îl divide egal şi îl transferă celulelor fiice se desfăşoară într-o ordine progresivă, precis reglată, ce formează **ciclul celular**. *Controlul ciclului celular* decide în ultimă instanţă dacă o celulă îşi va continua progresia prin ciclu (va creşte şi se va divide) sau va suferi o diferenţiere sau va trece într-o stare de repaus proliferativ. Pierderea controlului ciclului va genera o creştere celulară anormală (celule tumorale, defecte de dezvoltare) sau va duce la moarte celulară programată (apoptosis). Se pot produce de asemenea *erori* în segregarea cromosomilor în mitoză care vor genera anomalii cromosomice. Pentru aceste raţiuni, cunoaşterea proceselor ce alcătuiesc ciclul celular prezintă o importanţă deosebită pentru înţelegerea unor mecanisme patogenice generatoare de boli.

1. CICLUL CELULAR.

Ciclul celular reprezintă succesiunea de evenimente biochimice şi morfologice care se produc în viaţa unei celule, din momentul formării şi până la sfârşitul diviziunii sale. Ciclul celular are două mari perioade: *interfaza* şi *diviziunea* (figura 5.6).

Interfaza reprezintă perioada cuprinsă între două diviziuni succesive, în care se desfăşoară toate activităţile specifice unei celule. Evenimentul cel mai important al interfazei este *sinteza de ADN* (replicarea), prin care se *dublează cantitatea de material genetic* (4C). Ea se produce într-o perioadă limitată a interfazei, denumită *faza S*. Datorită acestui proces, interfaza poate fi subdivizată în trei etape succesive: *faza* G_1 (presintetică), *faza S* (de sinteză) şi *faza* G_2 (postsintetică sau premitotică).

Diviziunea celulară sau *faza M* ("mitotică") este alcătuită dintr-o serie de procese secvenţiale prin care materialul genetic (ADN), replicat în interfază, *se distribuie egal şi total* (segregare cromatidiană) formând doi nuclei distincţi, iar celula se împarte în două celule fiice (citokineză); acestea vor fi *identice* cu celula din care au provenit (vezi capitolul 1, figura 1.1.B). Prin replicarea ADN-ului şi diviziune se asigură *transmiterea fidelă a informaţiei genetice* în succesiunea generaţiilor celulare.

Durata ciclului celular poate varia mult între diferite ţesuturi, datorită variabilităţii fazei G_1, celălalte

faze fiind relativ constante ca durată. Pentru o durată medie de 24 ore, duratele aproximative ale fazelor sunt: G_1 = 10 ore, S = 9 ore, G_2 = 4 ore, M = 1 oră.

Tabelul 5.1. Caracteristicile principale ale fazelor ciclului celular mitotic[12]

PERIOADA	FAZA ŞI DURATA (ore)	EVENIMENTE	CANTITATE ADN	ASPECT LA MICROSCOPUL ELECTRONIC
Interfază	G_1 (10 h)	Sinteză intensă de ARN şi Proteine	2C	2n cromosomi monocromatidieni
	S (9h)	Sinteză de ADN şi histone	4C	
	G_2 (4h)	Sinteza proteinelor fusului de diviziune Sinteza factorului de declanşareal mitozei	4C	2n cromosomi bicromatidieni despiralizaţi
Diviziune	M (1h)	Profază Metafază Anafază Telofază	4C 4C 2C 2C	Cromosomi bicromatidieni condensaţi (vizibili la microscopul optic) Cromosomi monocromatidieni

1.1. FAZELE CICLULUI CELULAR MITOTIC

a. Faza G_1

Faza G_1 (în engleză *gap* – interval, lacună, gol – deoarece nu i se cunoştea semnificaţia) reprezintă faza de start a ciclului celular, pentru celulele stimulate (de factori de creştere) să se dividă (tabelul 5.1). Fiecare cromosom (puternic despiralizat) este *monocromatidian,* fiind alcătuit dintr-*o singură moleculă de ADN*. Cantitatea de material genetic este 2C molecule de ADN sub forma a 2n (46) cromosomi despiralizaţi. În prima parte a fazei G_1 (G_1A), se produce o sinteză intensă de substanţe (ARN, proteine) necesare creşterii şi funcţionării celulei. Se acumulează ARN şi proteine până la o concentraţie prag, numită **punct de restricţie** "R", după care celulele trec în subfaza G_1B, fiind *condiţionate* să intre în faza S şi să se dividă (figura 5.6).[13]

În anumite condiţii (lipsa factorilor de creştere, prezenţa unor inhibitori ai sintezei proteinelor etc.), celulele aflate în subfaza G_1A pot trece într-o fază de *activitate metabolică redusă*, numită faza G_0 sau G_1Q (de la "*quiescence*" - repaus, linişte), în care rămân viabile şi pot supravieţui timp îndelungat. Dacă aceste condiţii restrictive dispar, celulele G_0 pot reveni în G_1 şi apoi pot progresa spre faza S, deoarece îşi păstrează capacitatea de diviziune. Fazele G_1 şi G_0 sunt două stări fiziologice distincte ale celulei.

Unele celule aflate în subfaza G_1A (sub influenţa unor inductori ai diferenţierii) părăsesc definitiv ciclul celular şi trec în faza G_1D, ce corespunde *celulelor diferenţiate*; ele nu se mai divid şi mor după un anumit timp.

b. Faza S

Faza S (în engleză "*synthesis*"- sinteză) se caracterizează prin *sinteza de ADN* (realizată prin replicarea semiconservativă) şi *sinteza de histone* (vezi capitolul 5.A). În această fază cantitatea totală de ADN (2C) trebuie să fie replicată complet dar numai *o singură* dată; se produce astfel o *dublare* a cantităţii de material genetic (4C), condiţie obligatorie pentru desfăşurarea diviziunii celulare. Numărul de cromosomi rămâne 46, dar fiecare cromosom va fi **bicromatidian**, alcătuit din două cromatide identice (*"surori*"), deci va conţine două molecule de ADN.

Replicarea ADN în faza S este **asincronă**: unele segmente de ADN (bogate în perechi de baze G-C) se replică *precoce*, la începutul fazei S, iar alte segmente (bogate în perechi de baze A-T) se replică *tardiv*, la sfârşitul fazei S. Informaţii precise despre sinteza/replicarea ADN pot fi obţinute fie prin **autoradiografie** (cu ajutorul unui izotop radioactiv, de regulă timidină tritiată T^3H), fie prin **utilizarea bromodeoxiuridinei** (BrdU), un analog al timinei. Ele se vor încorpora în molecula nou sintetizată, marcând-o radioactiv, în primul caz, sau modificându-i configuraţia, în al doilea caz.

Uneori, în faza S a ciclului celular mitotic se produce un "schimb egal de material genetic

[12] Ciclul celular meiotic are o serie de particularităţi (vezi capitolul 5.C.1)

[13] Poziţia punctului de oprire G_1 este incertă, fie aproape de faza S, fie la mijlocul fazei G_1

între cromatidele surori" (SCE – în engleză ”sister chromatide exchange”) (Caseta 5.2)

CASETA 5.2

SCHIMBURILE DINTRE CROMATIDELE SURORI

În faza S a ciclului celular mitotic se poate produce un *"schimb egal de material genetic între cromatidele surori*" (SCE - *”sister chromatide exchange”*). Frecvenţa SCE este în mod normal de 7-10 per metafază; ea creşte însă în anumite boli (sindroamele de instabilitate cromosomică), precum şi după expunerea organismului la substanţe mutagene, clastogene (ce rup cromosomii) sau carcinogene. Astfel, SCE reprezintă o *metodă de evaluare a acţiunii mutagene* a diferiţilor compuşi chimici din mediul ambiant.

SCE care poate fi evidenţiat prin tehnici speciale. Celulele în cultură efectuează *două cicluri de replicare* în prezenţa unui analog al timinei, numit *5-bromodeoxiuridină* (BrdU). BrdU se *încorporează,* în locul timinei, în moleculele de ADN nou sintetizat, modificând proprietăţile de colorare ale cromatidelor. Folosind soluţia Giemsa sau colorantul fluorescent Hoechst 33258 se colorează cromatida în care numai *o catenă* a încorporat BrdU (figura 5.8.). În zonele în care se produce *SCE* se observă aspectul particular ("arlechin") al cromatidelor, cu zone colorate alternând cu zone necolorate.

c. Faza G_2

Faza G_2 se caracterizează prin sinteza unor proteine specifice şi a unor mici cantităţi de ADN (necesare în procesul de "corectare" a erorilor de replicare). Fiecare cromosom este *bicromatidian* (cantitatea de ADN este 4C), dar despiralizat. Spre sfârşitul fazei G_2 se activează/ sintetizează un *"factor de declanşare al mitozei"* (MPF), ce determină condensarea filamentelor de cromatină în cromosomi şi formarea fusului de diviziune.

O demonstraţie elegantă a existenţei MPF este fenomenul de *"condensare prematură a cromosomilor",* realizat prin *fuziunea* unei celule în diviziune (metafază) cu o celulă în interfază (figura 5.7.); se produce rapid o *condensare* precoce a filamentelor de cromatină interfazică, care în mod obişnuit, sunt puternic despiralizate şi deci invizibile la microscopul optic, iar membrana nucleară se dezasamblează.

În lipsa factorului de condensare celulele *se opresc în faza G_2* şi pot abandona ciclul celular, formându-se *celule tetraploide* (4n cromosomi); unele dintre ele devin celule binucleate (de exemplu cardiomiocitele adulte)(figura 5.6).

d. Faza M

Faza M corespunde diviziunii mitotice şi are o durată de aproximativ o oră. Ea începe cu diviziunea nucleului (mitoză) şi se termină cu diviziunea citoplasmei (citokineză). Subliniem din nou că, în această etapă, materialul genetic dublat în interfază (4C molecule ADN în 46 cromosomi bicromatidieni) *segregă*, adică *se distribuie în mod egal şi total* celulelor "fiice" (2C molecule ADN în 46 cromosomi monocromatidieni), care vor fi astfel identice cu celula din care provin. Procesul de "distribuţie" a materialului genetic prin diviziune se desfăşoară de obicei cu mare precizie asigurând *fidelitatea transmiterii informaţiei genetice* în succesiunea generaţiilor de celule. El poate suferi însă şi erori, care vor genera anomalii cromosomice.

1.2. EVOLUŢIA CELULELOR REZULTATE PRIN DIVIZIUNE

Celulele rezultate după diviziune pot evolua în trei direcţii: *proliferare, diferenţiere* şi trecerea în *stadiul de repaus*.

a. Proliferarea.

Celulele parcurg un nou ciclu şi se divid repetat; aceste "celule ciclice" alcătuiesc *compartimentul proliferativ* al organismului şi se găsesc în ţesuturile embrionare, măduva hematogenă, stratul bazal al epidermului, etc.

b. Diferenţierea.

Celulele părăsesc definitiv ciclul celular şi se transformă în *celule specializate*, cu anumite structuri şi funcţii, care *nu se mai divid* şi mor după un timp determinat. De exemplu: neuronii, celulele musculare, granulocitele, hematiile mature, etc.

c. Stadiul de repaus.

Unele celule (de exemplu: celulele "stem" sau suşă; limfocitele ş.a.) părăsesc ciclul celular în faza G_1 şi *rămân în faza* G_0, având o activitate metabolică mai redusă, dar păstrându-şi capacitatea de diviziune. Aceste celule formează *compartimentul neproliferativ*. În condiţii speciale, ele reacţionează la anumiţi stimuli din mediu (factori de creştere, unii hormoni, substanţe mitogene etc.) şi pot reintra în ciclul de diviziune. Un exemplu edificator îl reprezintă activarea limfocitelor T din sângele periferic sub acţiunea fitohemaglutininei (PHA); ele se transformă în limfoblaste, celule tinere, care se divid intens. Acest fenomen este utilizat pentru studiul cromosomilor prin culturi de limfocite (vezi capitolul 2.D.3).

1.3 CONTROLUL CICLULUI CELULAR.

Progresia ordonată şi desfăşurarea normală a ciclului celular sunt realizate prin reacţii biochimice în care multiple **kinaze ciclin-dependente (CDK)**(1-7) sunt *activate,* prin fixarea unor proteine numite **cicline** (A-H). După *activare,* fiecare complex proteic **CDK-ciclină** *fosforilează* anumite proteine sepecifice, necesare pentru reacţiile care au loc într-o anumită fază a ciclului. Apoi, complexul CDK-ciclină poate fi *inactivat* determinând trecerea la faza următoare a ciclului celular; inactivarea se poate face fie prin degradarea proteolitică a ciclinei (de către complexul proteasomilor, în urma *ubiquitinării*) fie prin intervenţia unor **molecule inhibitoare CKI**[14] *(proteine KIP: P21, P27 sau proteine INK: P15, P16).*

Interacţiunea dintre activarea şi inactivarea activităţilor CDK, în diferite momente cheie, asigură *progresia normală şi reglarea ciclului celular*. Fiecare fază a ciclului are un **control specific** (figura 5.9), realizat:

- în G_1 de complexul *CDK4-ciclina D,*
- la tranziţia G1/S de complexul *CDK 2-ciclină E,*
- în faza S de complexul *CDK 2-ciclină A,*
- iar în fazele G2 şi M de complexul *Cdc2-ciclină B*.

Tranziţia de la o fază la alta a ciclului celular este controlată prin mecanisme specifice, care acţionează în anumite **puncte de control** şi verifică dacă *anumite procese sunt terminate înaintea începerii altora* sau dacă nu există *alterări* ale componentelor ”maşinăriilor” de replicare şi segregare cromatidiană. În cazul identificării unor devieri de la normal sau defecte se blochează progresia celulei în ciclul celular (prin inactivarea CDK) şi se induce ”repararea” sau, dacă aceasta nu este posibilă, apoptoza (moartea celulară programată). Prin aceste mecanisme se asigură creşterea normală şi se elimină defectele, care nu vor trece astfel la celulele fiice.

Pe parcursul ciclului celular se produc următoarele evenimente corelate cu reglarea ciclului:

- În faza “de start” G1 celulele reacţionează la stimuli externi (mitogeni, factori de creştere) formându-se complexul *CDK4-ciclină D*, care fosforilează şi deci activează diferite proteine ce funcţionează în această fază. Printre acestea, un rol important îl are *proteina RB*[15], care (după fosforilare) eliberează un *factor activator (E2F)* al transcripţiei genelor ce funcţionează în faza S şi realizează replicarea ADN.
- Intrarea în faza S este determinată de un semnal activator, complexul *CDK2-ciclină E*. Formarea acestui complex este însă blocată de *inhibitorul P27 al CDK*; trecerea în faza S implică deci mai întâi degradarea proteolitică a P27 (prin sistemul *ubiquitină-proteasomi*)
- În **punctul de control G_1/S** are loc o verificare a parametrilor de evoluţie normală a celulei: orice alterare a ADN, depleţie de oxigen / metaboliţi / energie sau pertrurbare fiziologică declanşează sinteza *proteinei TP53* (“gardianul” genomului uman)[16] care activează transcripţia genei ce codifică *proteina P21,* un inhibitor al complexelor CDK-ciclină precum şi al PCNA (antigenul nuclear al celulelor proliferante)[17]. Celulele sunt oprite în G_1, oferindu-li-se timp de corecţie (figura 5.10); dacă alterările (în special cele din structura ADN) nu sunt reparate, celula va fi direcţionată spre *apoptoză*

[14] Moleculele CKI (de le *Cyclin-dependentKinase Inhibitors*) sunt de două feluri: *KIP* (de la *kinase inhibitory proteins*) care acţionează pe multiple complexe CDK-ciclină şi *INK* (de la *Inhibitors of CDK*) care acţionează specific pe complexul CDK-ciclina D

[15] *Proteina RB* este codificată de o genă supresoare de tumori situată pe 13q14; mutaţiile genei Rb pot produce anumite cancere, inclusiv retinoblastoame.

[16] Gena *TP53* este o genă supresoare de tumori; mutaţiile ei se regăsesc ăn peste 60% din cancere

[17] *PCNA* stimulează ADN polimeraza δ

- Progresia ulterioară prin faza S şi replicarea ADN sunt reglate de către *CDK2-ciclina A*[18].
- În faza G2, la **punctul de control G2/M,** se decide dacă celula *intră în mitoză*; acest lucru este determinat de activarea bruscă a complexului *Cdc2*[19]*-ciclină B* (numit anterior şi *factorul MPF*, de la "*Mitosis Promoting Factor*"). Celulele cu aberaţii cromosomice sau defecte ale aparatului mitotic sunt oprite să intre în mitoză (prin acţiunea TP53 şi P21, care blochează formarea complexului Cdc2-ciclina B).
- În cursul mitozei, în metafază, mai există un **punct de control M** în care diviziunea se opreşte şi este verificată *alinierea perfectă a cromosomilor*, înaintea separării cromatidelor surori. Acţiunea este realizată de către o *proteină inhibitoare ISS*; degradarea proteolitică a acestei proteine (determinată de *ubiquitină*) declanşează anafaza, prin separarea cromatidelor.
- La sfârşitul mitozei are loc *degradarea bruscă a ciclinei B* (produsă de către *ubiquitină*) şi inactivarea Cdc2, fenomene ce permit celulei să treacă într-o nouă fază G1.

Proliferarea celulară este reglată pe o durată limitată de *factori extracelulari* (hormoni, factori de creştere etc.) precum şi de anumite *gene de proliferare* sau "mitogene" (ce codifică cicline, receptori ai factorilor de creştere, proteine necesare sintezei de ADN, etc.). Deoarece prin mutaţia şi activarea lor anormală se produce o proliferare celulară aberantă şi cancer, aceste gene normale mai sunt numite şi **proto-oncogene.** O altă categorie de gene, numite *antiproliferative,* au rolul de a inhiba proliferarea celulară. De aceea aceste gene mai sunt numite **gene supresoare de tumori** sau **antioncogene.**

În cancer se produce o perturbare a desfăşurării normale a ciclului celular. Celulele canceroase, purtătoare de mutaţii, "scapă" de sub controlul mecanismelor care reglează proliferarea normală, parcurg rapid şi repetat ciclul celular, multiplicându-se permanent şi anarhic. Multe medicamente anticanceroase (citostatice) determină "blocarea" proliferării celulelor, prin oprirea evoluţiei lor în diferite faze ale ciclului celular.

2. MITOZA

Mitoza este o diviziune caracteristică celulelor somatice ale organismului. Ea asigură *creşterea* biomasei organismului, care, între stadiul de zigot unicelular şi cel de organism adult necesită 1x1014 diviziuni celulare. În unele ţesuturi, cum ar fi măduva hematogenă sau ţesutul epitelial, mitoza se desfăşoară continuu, pe tot parcursul vieţii, asigurând *reînnoirea* celulară dar şi *repararea* unor leziuni tisulare. Prin mitoză, materialul genetic dublat în interfază, se distribuie *total* şi *egal* celulelor fiice. Mitoza este o diviziune ecuaţională, deoarece din celula iniţială (celula "mamă") cu 46 cromosomi rezultă două celule "fiice" care au, de asemenea, 46 cromosomi (celule diploide). Mitoza permite *transmiterea cu mare fidelitate a informaţiei genetice* în succesiunea generaţiilor de celule, ceea ce asigură *stabilitatea* proceselor ereditare.

2.1. FAZELE MITOZEI

Mitoza este un proces continuu, care durează circa o oră, şi se desfăşoară în cinci etape succesive: profaza, prometafaza, metafaza, anafaza şi telofaza (figura 5.11). Fiecare din aceste faze sunt definite prin *acţiunea cromosomilor* şi distribuţia conţinutului citoplasmatic iar desfăşurarea lor este riguros controlată pentru a se asigura că fiecare celulă fiică va primi o copie exactă a genomului parental. Orice eroare de distribuţie va genera anomalii cromosomice la celulele fiice.

a. Profaza

La începutul profazei, în celule pot fi observate o serie de fenomene citoplasmatice şi nucleare.

În citoplasmă, centrosomul (un organit citoplasmatic perinuclear) se divide, iar cei doi centrosomi rezultaţi se deplasează în direcţii opuse, formând polii *fusului de diviziune*. Din fiecare centrosom se ansamblează radiar microtubulii, care formează fibrele fusului de diviziune, ce pot fi centriolo-cromosomiale şi centriolo-centriolare (figura 5.12.a). De asemenea, componentele microtubulare ale citoscheletului celular suferă transformări esenţiale, prin depolimerizare în dimeri de α-tubulină şi β-tubulină şi reansamblare în fibre ale fusului de diviziune. Alte componente, cum

[18] Acest complex produce fosforilarea proteinelor implicate în despiralizarea ADN precum şi a proteinei RPA care se fixează în punctele de origine ale replicării. După declanşarea replicării complexul RPA-origine este blocat de către CDK-ciclinaB şi replicarea nu se poate repeta (se face o singură dată) pâna ce celula nu trece prin mitoză, care degradează complexul CDK-ciclina B

[19] Cdc2 este o CDK specifică, numită aşa de la *cell division cycle mutant 2*

ar fi moleculele de γ-tubulină şi o proteină minoră - pericentrina formează prin ansamblare centriolii. Centriolii au un ciclu propriu de diviziune, după fiecare mitoză fiecare celulă fiică moşteneşte doi centrioli, iar în interfaza ce urmează ei se divid, astfel încât înainte de diviziune vor fi patru centrioli, grupaţi câte doi şi dispuşi perpendicular unul pe altul.

In nucleu are loc *condensarea fibrelor de cromatină* care se scurtează şi se îngroaşă, devin intens colorate şi vizibile la microscopul optic sub formă de *cromosomi*. Nucleolii diminuă ca mărime şi în cele din urmă se dezintegrează.

Fiecare cromosom este alcătuit din două *cromatide surori,* deoarece materialul genetic s-a replicat (dublat) în faza S a interfazei. Ele sunt ataşate la nivelul *centromerului*, o structură cromosomică esenţială pentru a asigura *distribuţia* (segregarea) fiecărei cromatide în celulele fiice.

Regiunile centromerice sunt bogate în secvenţe de ADN satelit α şi conţin cantităţi considerabile de heterocromatină constitutivă. Componenta centromerică cu rol în segregare este **kinetocorul**, care este situat în interiorul centromerului, având la examinarea prin microscopie electronică aspectul unui corpuscul fibros mai dens cu diametrul de 400 nm. Kinetocorul este structura de care se ataşază câte o fibră a fusului de diviziune. Locul unde se formează kinetocorul este dictat de o secvenţă specifică de ADN de circa 120 pb, dispusă într-o zonă rezistentă la acţiunea nucleazelor. Aceste secvenţe sunt similare la toţi cromosomii, deoarece experimental s-a constatat că prin schimbarea lor reciprocă între neomologi, funcţia de segregare se păstrează. Secvenţa de circa 120 pb din zona kinetocorului cuprinde trei tipuri de motive: a) CDE-I, formată din 9 pb, dispusă la capătul 5' al secvenţei kinetocorice şi conservată cu mici variaţii; b) CDE-II, formată din 80-90 pb ce conţin în proporţie de peste 90% AT (la eucariotele superioare prezintă secvenţe scurte repetitive, ce permit câteva distorsiuni considerabile ale dublului helix), dispusă în mijlocul secvenţei kinetocorice; c) CDE-III, formată din 11 pb, dispusă la capătul 3' şi înalt consevată. Importanţa acestor secvenţe este sugerată de consecinţele mutaţiilor la acest nivel. Astfel, mutaţiile în CDE-I şi CDE-II, duc la pierderea parţială a funcţiei centromerului, în timp ce mutaţiile punctiforme din porţiunea centrală a CDE-III duc la pierderea totală a funcţiei centromerului. De asemenea, pentru funcţia centromerului este important un complex proteic de 240 kD, format din trei polipeptide, denumit Cbf-III, cu rol de legare a secvenţei CDE-III. Mutaţiile în una din cele trei gene care codifică polipeptidele Cbf-III blochează segregarea cromatidelor surori.

Cromatidele conţin în regiunea centromerului o secvenţă specifică de ADN repetitiv, unde se asamblează complexe proteice specializate, numite **kinetocori** (figura 5.12.b). Fiecare cromatidă are un kinetocor, la care se va fixa un microtubul, ce leagă centromerul fiecărui cromosom de polii fusului de diviziune. Ataşarea cromatidelor este este rezultatul interventiei unor complexe proteice numite *coezina* si *condensina*.

b. Prometafaza

Prometafaza începe cu dezansamblarea membranei nucleare, datorată disocierii *laminei nucleare* în subunităţi de *lamină*. Simultan cu dezasamblarea membranei nucleare, are loc şi dezintegrarea reticulului endoplasmatic şi a aparatului Golgi în mici vezicole membranare, prin mecanisme insuficient clarificate. Dezintegrarea membranei nucleare este urmată de deplasarea fusului mitotic în arie pe care a ocupat-o nucleul. Unii microtubuli se ataşează la kinetocorii fiecărui cromosom, legând centromerul fiecărui cromosom de polii fusului de diviziune, ceea ce permite deplasarea cromosomilor spre ecuatorul celulei.

c. Metafaza

În metafaza propriu-zisă, cromosomii bicromatidieni se *aliniază independent* unul de altul la ecuatorul fusului de diviziune, în acelaşi plan, formând aşa-numita *placă metafazică*[20].

d. Anafaza

Anafază începe brusc cu separarea cromatidelor surori, simultan la toţi cromosomii, şi mişcarea lor spre polii opuşi ai fusului de diviziune. Prin acest proces de **disjuncţie (segregare) cromatidiană,** fiecare cromosom bicromatidian formează doi cromosomi monocromatidieni. După separare, cromosomii monocromatidieni sunt, în acelaşi timp, traşi spre polii fusului de diviziune prin scurtarea depolimerizarea) fibrelor centriolo-cromosomiale, respectiv prin alungirea (polimerizarea) fibrelor centriolo-centriolare.[21] Deplasarea cromosomilor spre poli se face *simultan, cu aceeaşi viteză.* Astfel, se produce împărţirea *totală şi egală* a materialului genetic între celulele fiice.

e. Telofaza

[20] Să reamintim că metafaza este stadiul optim pentru studiul cromosomilor, deoarece aceştia sunt contractaţi, bine individualizaţi morfologic şi dispuşi într-un singur plan.

[21] Funcţia microtubulilor poate fi demonstrată prin tratament cu colchicină, care inhibă formarea lor şi împiedică aranjarea cromosomilor în plan ecuatorial, precum şi migrarea lor anafazică.

Se caracterizează prin evenimente opuse celor din profază: cromosomii suferă un proces de *decondensare* şi *despiralizare,* fusul de diviziune se dezasamblează, se refac membranele ce delimitează nucleul, reticulul endoplasmic şi aparatul Golgi. Începe diviziunea citoplasmei (**citokineză**) prin acţiunea continuuă a unui inel contractil de actină, care produce diviziunea citoplasmei, cele două celule fiice se separă, fiecare conţinând 2n cromosomi monocromatidieni cu aspect interfazic şi o cantitate aproximativ egală din masa citoplasmatică.

2.2. REGLAREA MITOZEI

Desfăşurarea mitozei este riguros controlată (prin 3 puncte de control) de către celula „mamă" pentru a se asigura că fiecare celulă „fiică" va primi o copie exactă a genomului parental şi o cantitate aproximativ egală din masa citoplasmatică. Orice eroare de distribuţie va genera anomalii cromosomice la celulele fiice.

La tranziţia G_2/M există un *punct de control (1)* crucial, în care se decide dacă celula *intră în mitoză,* asupra căruia acţionează Cdc2 şi ciclina B. Activarea bruscă a *complexului Cdc2-ciclină B* (numit şi MPF de la *M-phase promoting factor*) determină iniţierea mitozei.

MPF acţionează prin activarea unor protein-kinaze sau prin fosforilarea directă a unor proteine responsabile pentru modificarile asociate mitozei. Printre proteinele ţintă se numara *condensinele* care sunt responsabile de declanşarea condensării cromosomilor, *laminele* a căror fosforilare determină fragmentarea membranei nucleare, *proteinele GM130* a căror fosforilare induce degradarea aparatului Golgi şi a reticulului endoplasmatic şi *proteinele asociate microtubulilor* care induc formarea fususlui de diviziune.

Dacă există o alterare cromosomică sau un defect al aparatului mitotic este activată proteina TP53, care induce sinteza proteinei 21, un inhibitor al CDK, ce blochează celula în G_2.

După ce fiecare cromosom s-a aliniat în placa metafazică procesul se opreşte (circa 20-30 minute) într-un nou *punct de control (2),* pentru a se verifica dacă toţi cromosomii sunt *perfect aliniaţi* înaintea separării cromatidelor surori (figura 5.13). Dacă totul este „perfect" atunci se declanşează degradarea proteolitică a proteinelor (*coezina* si *condensina*) ce ataşează cele două cromatide la nivelul centromerului, sub acţtiunea unui complex proteic cu activitate enzimatică numit *separază* care a fost activat de către complexul de promovare al anafazei, prin îndepartarea aşa-numitei *securine,* o componentă inactivatoare. Aceste fenomene permit separarea cromatidelor surori şi iniţierea anafazei.

În anafază există *punctul de control (3)* al mitozei când se produce inactivarea complexului Cdc2-ciclină B, prin degradarea proteolitică bruscă a ciclinei B (de către *ubiquitină*) şi inactivarea Cdc2, fapt ce va permite celulei *terminarea mitozei* şi trecerea într-o nouă fază G1.

2.3. ERORI DE DISTRIBUŢIE A MATERIALULUI GENETIC ÎN MITOZĂ

Principalele erori de distribuţie a materialului genetic în mitoză sunt: nedisjuncţia cromatidiană, întârzierea anafazică şi clivarea transversală a centromerului. Ele generează anomalii cromosomice în ţesuturile somatice (vezi capitolele 6.B.1 şi 10.C)

a. Nedisjuncţia cromatidiană

Nedisjuncţia cromatidiană apare atunci când cele două cromatide ale unui cromosom *nu se separă* în timpul anafazei mitozei, ci rămân unite şi migrează împreună în una din cele două celule fiice. Consecinţa acestei erori este apariţia unor celule anormale: una cu un cromosom în plus (2n+1) = *trisomică* (47 cromosomi) alta cu cromosomul respectiv lipsă (2n-1) = *monosomică* (45 cromosomi).

b. Întârzierea anafazică

Întârzierea anafazică constă în *migrarea cu întârziere* a unui cromosom monocromatidian, care în momentul formării membranelor nucleare va rămâne în afara nucleilor celulelor fiice. El formează un "*micronucleu"* care dispare la următoarea diviziune. Rezultă clone celulare cu 2n-1/2n, adică 45/46 cromosomi. Prezenţa micronucleilor (ce se formează din cromosomi care nu au migrat şi care nu au fost incluşi în nici unul din nucleii fii), indică tulburări ale desfăşurării mitozei, ce pot fi produse de cauze externe. De aceea *testul micronucleilor* este utilizat pentru studiul efectelor cromosomice produse de radiaţiile ionizante sau alţi factori mutageni.

c. Clivarea transversală a centromerului

Clivarea *transversală* a centromerului produce **isocromosomi** ("cromosomi cu braţe egale") alcătuiţi numai din braţe scurte (p) sau numai din braţe lungi (q)(figura 5.14). Aceştia sunt anormali, deoarece au duplicate genele de pe braţul prezent şi le lipsesc genele de pe braţul pierdut. În patologia umană au fost descrişi mai frecvent isocromosomi Xp sau Xq în disgeneziile gonadale sau i(12p) în sindromul Pallister-Killian, cu anomalii congenitale multiple şi retard mintal.

d. Absenţa citokinezei

Celulele somatice după duplicarea ADN-ului în interfază au 2n cromosomi bicromatidieni (4C). Dacă are loc mitoza dar nu se produce citokineza rezultă o celulă *tetraploidă* cu 4n cromosomi monocromatidieni (4C). Acest proces, numit şi *endomitoză*, se observă, în mod fiziologic, în procesul de regenerare hepatică.

e. Consecinţele erorilor mitotice

Erorile de distribuţie a materialului genetic în mitoză determină apariţia unor anomalii de număr şi structură ale cromosomilor în celulele fiice. Ele vor avea consecinţe asupra evoluţiei celulelor, influenţând *viabilitatea şi capacitatea de multiplicare*. Aceşti parametri depind mai ales de cromosomul afectat şi tipul de anomalie cromosomică (trisomie sau monosomie) produsă. Dacă celulele rezultate sunt viabile şi se multiplică ulterior, rezultă o *clonă* (grup de celule ce au o particularitate comună şi provin prin mitoze repetate dintr-o celulă iniţială modificată) iar în organism apar **mozaicuri cromosomice** (figura 5.15). Se întâlnesc mai frecvent în sindromul Turner (25% cazuri), sindromul Down (2-4% bolnavi) şi sindromul Klinefelter (vezi capitolul 10.C)

Apariţia unor clone celulare anormale la un organism, prin oricare din erorile amintite, determină efecte diferite în raport cu *momentul ontogenetic* în care s-a produs accidentul (şi deci cu proporţia celulelor anormale care se formează). Perturbarea precoce şi apariţia unui număr mare de celule anormale în primele stadii de dezvoltare are consecinţe negative majore (anomalii congenitale) asupra fenotipului purtătorilor de anomalii cromosomice (vezi capitolul 10.C). Un alt factor ce influenţează efectele fenotipice ale clonelor anormale este distribuţia lor în diferite ţesuturi. A fost descris, de exemplu, un *mozaicism limitat la placentă*, cu un făt euploid (vezi capitolul 18.3).

C. TRANSMITEREA INFORMAŢIEI GENETICE DE LA PĂRINŢI LA DESCENDENŢI

Transmiterea informaţiei genetice în succesiunea generaţiilor de organisme este un proces complex care se desfăşoară în două etape: formarea gameţilor, celule sexuale mature cu un număr haploid de cromosomi (23 la om) şi fecundarea lor, care reface la zigot numărul diploid de 46 de cromosomi, caracteristic speciei umane şi realizează o structură genetică nouă, unică şi constantă (individualitatea genetică) caracteristică viitorului individ. Ambele etape se efectuează de obicei cu mare precizie dar uneori se pot produce erori care generează anomalii genetice.

1. GAMETOGENEZA

Gametogeneza are loc în gonade, prin meioză - un tip special de diviziune reducţională - care asigură transmiterea informaţiei genetice la generaţia următoare şi îndeplineşte două funcţii majore:

- *Reduce la jumătate (n) numărul de cromosomi* şi asigură astfel, după fecundare, menţinerea constantă a numărului de cromosomi ai speciei;
- Creează *diversitatea genetică* ce apare la copii născuţi din aceiaşi părinţi[22], prin fenomenele de recombinare genică (din profaza I) şi recombinare intercromosomică (din anafaza I); meioza este principala sursă de variabilitate genetică.

1.1 CARACTERELE GENERALE ALE MEIOZEI

[22] In acest context, termenul de "reproducere" este impropriu pentru că individul ce rezultă după fecundare nu este o reproducere a nici unuia din părinţi.

Meioza este un proces complex care se realizează prin *două diviziuni succesive*: meioza I (diviziunea meiotică primară, heterotipică, reducţională) şi meioza II (diviziunea meiotică secundară, homotipică, ecuaţională), neseparate de interfază, deci ADN se replică numai o singură dată.

a. Meioza I

Este o formă specială de diviziune celulară[23], unică şi foarte complexă, cu o durată lungă, în special la organismele feminine. Prezintă patru etape: profaza I, metafaza I, anafaza I, telofaza I, fiecare cu anumite particularităţi (figura 5.16.A).

(1). Profaza I este foarte lungă (90 % din durata meiozei I) şi cuprinde cinci stadii.

- **Leptoten**. Prin condensarea fibrelor de cromatină, cromosomii devin vizibili ca *filamente subţiri şi lungi*, ataşate prin telomere la membrana nucleară. Astfel, datorită lungimii mari şi grosimii mici a cromosomilor, deşi cromosomii sunt bicromatidieni, ei apar *monocromatidieni* la examinarea la microscopul optic.
- **Zigoten.** Cromosomii omologi (matern şi patern) se apropie, se dispun paralel de-a lungul cromatidelor, fenomen numit *sinapsă* sau *conjugare cromosomică*; se realizează astfel o aliniere "genă la genă" sau, mai exact, o împerechere între secvenţele omologe[24], rezultând structuri numite *bivalenţi* (în realitate fiecare unitate este o *tetradă,* deoarece prezintă patru cromatide). Cromosomii omologi sunt *uniţi (lipiţi)* în anumite regiuni, la nivelul *complexului sinaptonemal*, vizibil la microscopul electronic. O excepţie de la acest model de sinapsă, este prezentă la sexul masculin, la care cromosomii X şi Y, nefiind omologi, fac sinapsă "cap la cap", printr-o mică regiune omologă ("regiune pseudoautosomală") aflată la capătul braţelor scurte, şi formează prin condensare o structură specifică - *vezicula sexuală*.
- **Pahiten**. Cromosomii se scurtează şi se îngroaşă. Din loc în loc devin vizibile nişte puncte mai intens colorate numite *cromomere*, al căror număr şi poziţie sunt caracteristice fiecărui cromosom[25]. În faza de pahiten are loc fenomenul de **încrucişare cromosomică** între cromosomii omologi - **crossing-over** - care constă în "ruperea" cromatidelor nesurori *exact în acelaşi punct* şi schimbarea *reciprocă* (încrucişată) a unor *fragmente egale* („recombinare omologă")[26]; astfel, un fragment de cromatidă de pe un cromosom matern se *transferă* pe omologul său patern şi invers, realizând *o nouă combinaţie genică* cu material genetic de la ambii părinţi (vezi figura 3.4.). Fenomenul implică numai două din cele patru cromatide, care vor conţine gene de la ambii părinţi; se realizează astfel o **recombinare genică (intracromosomică)**, care reprezintă o *sursă de variabilitate genetică,* datorită noilor combinaţii de gene care apar şi se transmit la descendenţi (vezi capitolul 3.A.2.2). La om se produc 1-3 recombinări per cromosom, în funcţie de dimensiunea cromosomului. În meioza masculină totalul recombinărilor este de circa 50 per celulă, în timp ce meioza feminină se caracterizează printr-un număr mai mare de recombinări (aproximativ 70 per celulă). Frecvenţa recombinării care se produce între două gene situate pe acelaşi cromosom depinde de distanţa dintre ele; calculul frecvenţei de recombinare permite alcătuirea *hărţilor cromosomice,* care indică localizarea genelor în lungul cromosomilor (vezi capitolul 3.D.1).
- **Diploten**. Cromosomii omologi încep să se separe longitudinal, ca şi cum "s-ar respinge" reciproc. Cromatidele lor rămân în contact la nivelul anumitor puncte ("chiasmata", pluralul de la "chiasma") care marchează localizarea crossing-over-ului.
- **Diakineza**. Cromosomii devin mai scurţi şi mai groşi, omologii se separă aproape complet, iar chiasmatele se observă numai la capetele lor *(terminalizarea chiasmatelor*). În această fază se observă clar că fiecare bivalent conţine patru elemente: cromatidele surori sunt unite prin centromer, iar cromatidele nesurori sunt unite prin chiasmatele la nivelul cărora s-a produs crossing-over-ul.

---

[23] Există două diferenţe majore între meioză şi mitoză: prin meioză rezultă celule haploide, care genetic sunt diferite

[24] Alinierea / împerecherea cromosomilor omologi "margine" la "margine" la nivelul sinapselor este favorizată de secvenţele repetitive multiple şi identice ca tip şi localizare din cei doi cromosomi omologi.

[25] Dispoziţia cromomerelor coincide cu cea a benzilor G (vezi capitolul **Cromosomii umani**)

[26] Mecanismul molecular al recombinării la om nu este prea clar dar se presupune ca intervine un sistem genic similar cu genele „SOS" descrise la procariote, care prin enzimele codificate taie, schimbă şi resudează fragmentele de cromosomi.

(2) Metafaza I. Membrana nucleară dispare complet şi se formează fusul de diviziune. Bivalenţii, formaţi din cromosomi bicromatidieni, se fixează cu centromerul pe filamentele fusului şi se deplasează spre placa metafazică, la ecuatorul celulei. Centromerul cromosomilor omologi se dispune aleatoriu de o parte şi de alta a planului ecuatorial. Metafaza I este etapa optimă de studiu a cromosomilor în meioză.

(3). Anafaza I cuprinde un fenomen genetic foarte important: **disjuncţia cromosomică**. Cei doi cromosomi bicromatidieni ai fiecărui bivalent *se separă* şi se repartizează câte unul la fiecare celulă fiică. Spre deosebire de mitoză, *cromatidele surori nu se despart,* ci rămân ataşate la nivelul centromerului. Apoi are loc *migrarea anafazică* prin deplasarea cromosomilor (bicromatidieni) simultan şi cu aceeaşi viteză, spre polii opuşi ai celulei. În final, se produce o reducere a numărului de cromosomi, de la 2n la n şi fiecare celulă va avea numai un exemplar din perechea de omologi. Acest fenomen stă la baza primei legi a lui Mendel, *legea segregării.*

Segregarea sau separarea aleatorie a fiecărei perechi de cromosomi omologi determină *asortarea independentă a omologilor,* fenomen denumit **recombinare intercromosomică**. Deoarece fiecare pereche de cromosomi *se separă independent* de celelalte perechi rezultă un număr mare de combinaţii cromosomice în gameţi, în raport direct cu numărul de perechi de cromosomi ai speciei (figura 5.17). Se formează 2^{23} tipuri de gameţi, deci peste 8,4 milioane de gameţi diferiţi, la fiecare din cele două sexe.

Asortarea independentă a cromosomilor omologi, prin fenomenul de recombinare cromosomică, asociată cu recombinarea intracromosomică prin crossing-over, *explică marea variabilitate a gameţilor*. Ea confirmă cea de a doua lege a lui Mendel, referitoare la *combinarea liberă a "factorilor ereditari"* (genelor) astfel că fiecare gamet, care rezultă în urma meiozei, are un set unic de gene, diferit de al celorlalţi. Prin combinarea, pe bază de probabilitate, a gameţilor masculini cu cei feminini în procesul de fecundare are loc formarea unor *zigoţi diferiţi din punct de vedere genetic*, iar indivizii rezultaţi vor fi **unicate genetice**.

(4). Telofaza I. Are loc reasamblarea nucleilor; citokineza se realizează fără separarea completă a celulelor fiice, care rămân ataşate printr-o punte citoplasmatică, formând o *diadă*.

b. Meioza II

Meioza II începe imediat după terminarea meiozei I şi se aseamănă cu o diviziune mitotică dar care se realizează în celule cu număr haploid de 23 de cromosomi bicromatidieni (dintre care unii sunt recombinanţi) şi nu este precedată de o replicare a ADN. Este deci o *diviziune homotipică, ecuaţională*. Ea cuprinde, de asemenea, cele patru stadii: profaza II, metafaza II, anafaza II şi telofaza II (figura 5.16. B).

(1). Profaza II: cromosomii bicromatidieni se individualizează, cromatidele surori devin vizibile distinct, iar membrana nucleară dispare.

(2). Metafaza II. Cromosomii se condensează şi se ataşează fiecare pe câte un filament al fusului de diviziune, aliniindu-se în *placa metafazică ecuatorială.*

(3). Anafaza II. Prin diviziunea centromerelor - *disjuncţie cromatidiană* - fiecare cromosom se separă în două cromatide; acestea devin cromosomi independenţi şi se deplasează spre polii opuşi ai celulelor.

(4). Telofaza II. Din cele două celule fiice se formează *patru seturi haploide de cromosomi monocromatidieni* (câte două pentru fiecare celulă). În final, prin reorganizarea nucleilor şi separarea celulelor rezultate apar *patru celule haploide*, care prin maturare se transformă în gameţi fecundabili. *Gameţii rezultaţi nu sunt identici*, fiecare are o altă combinaţie de gene datorită fenomenelor de crossing-over şi segregare independentă a cromosomilor.

1.2. PARTICULARITĂŢILE GAMETOGENEZEI LA BĂRBAT ŞI FEMEIE

Meioza prezintă o serie de particularităţi la cele două sexe, legate de cronologia, desfăşurarea şi finalitatea ei. La bărbat se formează în final patru spermatozoizi, în timp ce la femeie, prin eliminarea globulilor polari, rezultă doar un ovul.

a). **Gametogeneza masculină**

Spermatogeneza începe la *pubertate* (sub acţiunea FSH şi LH) şi *continuă* toată viaţa adultă. Fiecare spermatocit primar va produce prin meioza I două spermatocite secundare haploide, care

după ce parcurg meioza II dau naştere la patru spermatide; ele se vor diferenţia în spermatozoizi, de două feluri: jumătate au *un cromosom X*, iar jumătate au *un cromosom Y*. Cromosomii X şi Y conţin fiecare gene de sexualizare specifice fiecărui sex. Aşa cum am văzut, în profaza meiozei I ei se unesc *„cap la cap”* (şi nu *„margine la margine”*, ca autosomii); această configuraţie împiedică schimbul de gene dintre X şi Y şi, deci, păstrarea unui singur tip de determinanţi sexuali, fie masculini, pe Y, fie feminini pe X. Acest fenomen, important în evoluţie, a permis realizarea gonocorismului (gonade distincte la indivizi diferiţi)

Întregul proces de spermatogeneză durează aproximativ 64 de zile, indiferent de vârstă; deci meioza masculină este un proces *rapid* iar bărbatul este totdeauna „tânăr” prin gameţii săi.

Meioza masculină este un proces *intens*, 1 ml de spermă conţinând în mod normal circa 70 de milioane de spermatozoizi. Ţinând cont de faptul că numai un singur spermatozoid este fecundant, am putea aprecia că gametogeneza masculină este „neeconomică” şi prin aceasta, lipsită de sens biologic („natura nu face risipă”). În realitate numărul enorm de spermatozoizi realizează o populaţie considerabilă în care şansele de realizare a unui fenomen sunt teoretic egale cu cele de realizare a fenomenului contrar. Aşadar, şansele unui spermatozoid cu X de a fecunda un ovul cu X şi a da un zigot XX sunt egale cu şansele unui spermatozoid cu Y de a se uni cu un ovul cu X şi de a forma un ou XY. În felul acesta *proporţia sexelor la naştere este aproape 1:1*.

Studiile efectuate asupra timpului şi ritmului desfăşurării meiozei masculine au evidenţiat că acest proces este *autoreglabil,* căci odată declanşat el se autoîntreţine *ritmic*, ca „o reacţie în lanţ”, nefiind condiţionat de factori externi; dar meioza masculină este *sensibilă* la acţiunea factorilor de mediu (poziţia intra-abdominală în criptorhidie, temperatura ridicată, ischemia) care pot reduce eficenţa spermatogenezei.

Desfăşurarea ritmică şi regulată a meiozei masculine asigură *o deplină siguranţă procesului de distribuţie al cromosomilor*. Creşterea vârstei tatălui nu produce o creştere a frecvenţei erorilor de distribuţie şi deci a anomaliilor cromosomice. În schimb, meioza masculină produce fără oprire cópii celulare identice (20-25 cicluri replicative pe an). Dacă apare o mutaţie genică aceasta este copiată neîntrerupt: la vârste tinere numărul de celule ce vor avea mutaţia este mic dar la vârste mai înaintate el devine semnificativ, producând un veritabil *mozaic germinal*. De aceea, odată cu creşterea vârstei, bărbaţii sănătoşi au un risc crescut şi recurent de a avea copii cu afecţiuni monogenice autosomal dominante (neurofibromatoză, acondroplazie, ş.a.) (vezi capitolul 5.D.6), deoarece o mutaţie apărută este copiată neîntrerupt.

Tabel 5.2 Diferenţe în gametogeneză la bărbat şi femeie

	Bărbat	Femeie
Debut	La pubertate	În viaţa embrionară
Desfăşurare	Continuă	Discontinuă
Număr de mitoze în formarea gameţilor	30-500	20-30
Reglare	Autoreglabil	Condiţionat de factori externi
Număr de gameţi per meioză	4 spermatide, de două feluri (cu X şi cu Y)	1 ovul + 3 globule polare (numai cu X)
Durata procesului	Rapid: 64 zile	Lent: 10-50 de ani
Intensitate: număr de gameţi în viaţa adultă	Intens: circa 100-200 milioane per ejaculare	F.puţin intens: 1 ovul per ciclu menstrual
Erori	De copiere (risc de mutaţii genice)	De distribuţie a materialului genetic (risc de anomalii cromosomice)

b) Gametogeneza feminină

Spre deosebire de bărbat, la femeie ovogeneza începe *prenatal şi este discontinuă*: în luna a III-a de viaţă intrauterină ovogoniile înep să se dividă şi se transformă în ovocit primare; în luna VIII-a ovogoniile dispar aproape complet deoarece s-au diferenţiat în ovocite. Deci, spre deosebire de bărbat, la care spermatogoniile se produc (după pubertate) continuu până la bătrâneţe, „capitalul” de ovocite al ovarului este limitat (la naştere există circa 2 milioane de ovocite în fiecare ovar iar la pubertate mai putin de 200.000).

Ovocitele primare au deasemenea câteva particularităţi ce le deosebesc de spermatocite: sunt celule mari, au un nucleu *excentric* şi încep imediat meioza I (luna III-a) dar nu depăşesc stadiul de leptoten, fiind blocate într-o „fază de aşteptare" numită dictioten (prin intervenţia unei proteine numită OMI de la *„oocyte meiosis inhibitors"*); ele rămân în această fază mulţi ani, până la ovulaţie. După pubertate, sub acţiunea LH hipofizar, cîteva ovocite îşi încep *lunar* maturarea dar de regulă numai unul singur (maximum două) termină meioza I, formând două celule haploide inegale (datorită poziţiei excentrice a nucleului): ovocitul II (care preia aproape toată citoplasma ovocitului I) şi primul globul polar. Meioza II începe imediat dar este oprită în metafaza II şi nu se reia decît dacă s-a produs fecundarea. Atunci are loc expulzia celui de al doilea globul polar. Devine evident că meioza la femeie este *un proces discontinuu şi condiţionat de factori externi* (FSH şi LH, ovulaţia, fecundarea). La femeie, prin meioză, dintr-un ovocit I rezultă *o singură celulă sexuală matură*, aptă de fecundare (şi trei globule polare, care vor degenera). Toate ovocitele vor avea un cromosom X.

Ritmul lent al ovogenezei (un ovul pe lună) face ca gametogeneza feminină să fie *puţin intensă*: în cursul perioadei reproductive (de numai 30 ani, deoarece meioza feminină *se opreşte definitiv* la menopauză) se maturează numai 300-400 ovocite. Din acest motiv apar puţine „erori de copiere" (se produc copii puţine dar impecabile). Totuşi, ovogeneza nu este ferită de accidente: odată cu creşterea vârstei reproductive, mai ales după 35 de ani, se produc mai frecvent *accidente de distribuţie a cromosomilor* rezultând gameţi cu anomalii cromosomice de număr care, după fecundare, vor produce zigoţi anormali. Aceste erori sunt determinate de particularităţile meiozei la femeie şi în special de faptul că meioza este discontinuă, necesită intervenţia unor factori externi iar ovocitele...*"au vârsta femeii"*.

1.3. ACCIDENTE DE DISTRIBUŢIE A LE MATERIALULUI GENETIC ÎN MEIOZĂ ŞI CONSECINŢELE LOR

În desfăşurarea meiozei se pot produce două categorii de erori, corespunzătoare celor două procese majore care au loc în acest proces: recombinarea genică şi segregarea (disjuncţia) anafazică a cromosomilor. Prima categorie este reprezentată de crossing-overul inegal iar cea de a doua de nedisjuncţia meiotică, pierderea unor cromosomi sau nesepararea citelor de ordinul II.

a. Erorile de recombinare

Fenomenul normal de recombinare genică produs în profaza MI (pahiten), prin crossing-over, presupune alinierea cromosomilor omologi, împerecherea secvenţelor omologe şi un schimb *reciproc şi egal* de material genetic. Uneori se poate produce accidental un **crossing-over inegal**, o recombinare „ilegitimă", care are loc între secvenţe omologe de ADN (deseori repetitive) dar nealele (nu sunt situate în aceeaşi poziţie în cromosomi), care s-au aliniat (împerecheat) incorect în zigoten (figura 5.18); după crossing-over rezultă cromosomi cu *duplicaţii* sau *deleţii* ale unor segmente mici (ce conţin una sau mai multe gene).

Fenomenul de **recombinare omologă nealelică** (inegală sau ectopică) este considerat procesul fundamental al *evoluţiei unor gene prin duplicaţie* (de exemplu, evoluţia genelor globinelor; capitolul 3, figura 3.10) precum şi mecanismul creşterii numărului de secvenţe repetate în tandem, din structura ADN înalt repetitiv (vezi figura 6.8). CO inegal are, evident, şi consecinţe patologice deoarece duplicaţia sau deleţia unor mici regiuni cromosomice poate produce un fenotip anormal. Acest mecanism de producere a "macroleziunilor din ADN" a fost identificat relativ recent, prin analiză moleculară, în mai multe boli (talasemia α, boala Charcot-Marie-Tooth, daltonismul, ş.a) precum şi în multe sindroame cu microdeleţie sau microduplicaţie (care alcătuiesc împreună grupul de *boli genomice*) (vezi capitolul 6.B.1.3.a).

- **Boala Charcot-Marie-Tooth** (CMT) sau *neuropatia motorie şi senzorială ereditară* este cea mai frecventă boală neurologică ereditară (1:2500 nn), se caracterizează prin degenerarea progresivă a mielinei nervilor periferici şi consecutiv, hipotonie şi atrofie musculară (în special peonieră). Boala este heterogenă (3 tipuri) cel mai frecvent fiind tipul 1A, autosomal dominant, cu locusul lângă centromerul cromosomului 17 (în banda 17p11.2). CMT 1A este asociată cu o duplicaţie a unui segment de ADN de 1.5 Mb, ce conţine gena *PMP22* ce codifică o proteină a mielinei periferice (figura 5.18). La fiecare capăt al genei se află o secvenţă nucleotidică identică, de circa 30 K.b,

numită MITE[27]; prin aliniere incorectă şi CO inegal rezultă un cromosom cu duplicaţie genei care va da clinic CMT şi un cromosom cu deleţia genei care va da clinic o altă boală neurologică HNPP (de la *hereditary neuropathy with liability to pressure palsies – neuropatie ereditară cu predispoziţie la pareze presionale*) .

- **Sindroamele cu microdeleţii sau microduplicaţii** (vezi capitolul 10.C.2) sunt sindroame dismorfice în care prin deleţia / duplicaţia unor segmente cromosomice mici (identificabile prin tehnici de înaltă rezoluţie sau FISH, vezi capitolul 2.D.3.a) se produce pierderea (*haploinsuficienţa*) sau trisomia parţială a unor gene multiple, contigue (vecine) (de unde şi denumirea *sindroamele genelor contigue*). Analiza moleculară fină a relevat că punctele de ruptură se localizează în secvenţele repetitive *identice* ce flanchează segmentul implicat şi că recombinarea anormală între copiile vecine ale secvenţele repetitive, produce deleţia sau duplicaţia regiunii respective (figura 5.19); un alt exemplu îl reprezintă *sindromul velocardiofacial (deleţia 22q11.2)*, cu o frecvenţă de 1:4000 nn.

b. Erorile de distribuţie

În anafazele meiozei I şi II materialul genetic este împărţit egal şi total celulelor fiice. Acest proces poate suferi, ca şi în mitoză, erori de distribuţie (de segregare) care vor duce la formarea unor *gameţi neechilibraţi genetic*; după fecundarea lor vor rezulta *zigoţi anormali*. În funcţie de evoluţia acestor zigoţi se pot produce avorturi spontane, nou-născuţi morţi sau nou-născuţi vii plurimalformaţi. Mecanismele principale de apariţie a acestor erori sunt: *nedisjuncţia* (cromosomică, cromatidiană), *pierderea unor cromosomi* (ca urmare a migrării întârziate în anafază), *nesepararea citelor de ordinul II* (celule rezultate după meioza II).

(1). Nedisjuncţia este lipsa separării cromosomilor ce formează o pereche de omologi, în anafaza meiozei I (*nedisjuncţie cromosomică*) sau a cromatidelor surori ale unui cromosom (*nedisjuncţie cromatidiană*) în meioza II; datorită acestei erori, ambele „unităţi" (cromosomul sau cromatida) trec într-o celulă fiică şi vor lipsi în cealaltă celulă. Prin nedisjuncţie în meioza I sau II rezultă gameţi **disomici** şi **nulisomici** care, după fecundarea cu un gamet normal, vor forma un zigot trisomic sau monosomic (vezi capitolul 6.B.1). Deşi dezechilibrul cromosomic produs de cele două tipuri de nedisjuncţia este de acelaşi tip, între nedisjuncţia din meioza I şi nedisjuncţia din meioza II sunt totuşi diferenţe mai subtile (figura 5.20). Dacă eroarea are loc în meioza I, toţi gameţii vor fi anormali iar gametul disomic, cu 24 de cromosomi, va avea ambii cromosomi (matern sau patern) ai perchii; dacă nedisjuncţia are loc în meioza II numai jumătate din gameţi vor fi anormali iar gametul disomic va avea ambele copii (cromatide) fie ale cromosomului matern, fie ale celui patern (disomie uniparentală).[28] (Caseta 5.3)

(2). Întârzierea anafazică constă în pierderea unui cromosom în cursul anafazei meiozei I sau II. În consecinţă, apar *gameţi nulisomici* (n-1) care prin fecundare, vor forma *zigoţi monosomici* (2n-1); majoritatea sunt incompatibili cu supravieţuirea (excepţie 45, X)

(3). Nesepararea "citelor" de ordin II este un eveniment prin care se formează *gameţi diploizi*, care au întregul set de cromosomi (2n). Prin fecundare cu gameţi normali apar *zigoţi triploizi,* neviabili (3n = 69 cromosomi).

CASETA 5.3

NEDISJUNCŢIA

Nedisjuncţia reprezintă o eroare de segregare (separare) a cromosomilor în anafaza meiozei sau mitozei. În nedisjuncţia meiotică se pot produce gameţi anormali (disomici şi nulisomici) care, după fecundare, vor da zigoţi cu anomalii cromosomice numerice. In nedisjuncţia cromatidiana se formează (în diferite momente ale dezvoltării) clone celulare anormale, ce vor evolua alături de celulele normale, formând un mozaic cromosomic. Trebuie să precizăm că există două tipuri de erori de separare: (1) nesepararea cromosomilor omologi (meioza I) sau a cromatidelor surori (meioza II) (figura 5.20); (2) separarea prematură a cromatidelor surori în meioza I în loc de meioza II. Ambele tipuri de erori produc gameţi anormali.

Nedisjuncţia este un fenomen „tulburător" atât din punct de vedere teoretic cât şi din punct de vedere practic. „Tulburător" pentru că ridică câteva întrebări importante dar dificile: este frecvent? se produce la fel de des în meioza maternă şi paternă? care sunt cauzele nedisjuncţiei? poate fi evitată? care este riscul de nedisjuncţie şi deci de naştere a unor feţi cu anomalii cromosomice de număr?

[27] MITE (de la *mariner insect transposon-like element*) are o structură similară cu transposonul *mariner* de la insecte. MITE nu este însă un transposon activ; în genomul uman au mai fost identificate si alte secvenţe tip MITE dar originea lor este misterioasă.

[28] În această situaţie, când ne referim la cromosomi avem în vedere centromerele deoarece o parte din materialul lor s-a schimbat prin CO, deci fiecare cromosom are şi segmente materne şi paterne.

La prima întrebare răspunsul este afirmativ: nedisjuncţia este frecventă, mai ales în meioză şi în mod special în meioza maternă. Se estimează că 8% din toate concepţiile (zigoţii) umane au anomalii cromosomice; majoritatea sunt neviabile şi se elimină prenatal, astfel că numai 0,7-1% din nou născuţii vii au o anomalie cromosomică. În toate cazurile predomină anomaliile numerice (aproape 90%), produse în special de nedisjuncţie.

Originea nedisjuncţiei, maternă sau paternă, se poate stabili în prezent relativ uşor cu ajutorul unor markeri ADN polimorfici. Toate studiile demonstrează că nedisjuncţia este mult mai frecventă în ovogeneză, în special în meioza I. Dacă ne referim numai la trisomia 21, cea mai frecventă boală cromosomică (1:700 nn), s-a stabilit (Antonarkis,1993) că în 92% din cazuri sindromul Down este produs prin nedisjuncţie maternă în meioza I, în 5% din cazuri prin nedisjuncţie paternă în meioza II şi în 3% din cazuri prin nedisjuncţie în mitozele postzigotice. La aceste date clare se adaugă un alt lucru cert: riscul nedisjuncţiei creşte odată cu creşterea vârstei reproductive materne, mai ales după 35 de ani. Statisticile, pe loturi mari, sunt foarte detaliate stabilind un risc precis pentru fiecare an de vârstă; dar pentru a ilustra fenomenul este suficient să precizăm că la gravidele de 30 de ani riscul naşterii unui copil cu sindrom Down este de 1:1000; el creşte la 1:100 la 37 de ani şi la 1:10 peste 45 de ani (Gardner şi Sutherland, 1996). Nedisjuncţia maternă este principala „cauză" a sindromului Down şi ale altor trisomii autosomale (după Hassold, 1996 peste 50% din ovocitele ovulate la femei de 40-45 de ani pot fi aneuploide). Sunt totuşi situaţii în care nedisjuncţia meiotică paternă este regula (de exemplu trisomia XYY) sau este relativ frecventă (70% din sindromul Turner, 45,X).

Care sunt cauzele nedisjuncţiei meiotice? Aici există trei certitudini dar care ...nu rezolvă problema, deşi sunt utile în practica sfatului genetic.

(1) Efectul vârstei materne (ca factor predispozant la nedisjuncţie) este sigur şi foarte probabil se corelează cu particularităţile meiozei materne[29], care (printre altele) blochează ovocitele timp de câteva decade în profaza meiozei I („ovulele au vârsta femeii"). Aceasta duce la o recombinare meiotică aberantă (sinapse incorecte, schimburile intercromosomice cu o rată redusă şi o localizare anormală) şi la anomalii în formarea fusului de diviziune. Nu trebuie însă să uităm că numai un sfert din cazurile de sindrom Down se nasc din femei peste 35 de ani; deci nedisjuncţia maternă are probabil şi alte cauze decât vârsta maternă reproductivă avansată, care, de ce nu, ar putea acţiona şi la femeile peste 35 de ani. Si mai trebuie să spunem clar un lucru: la 40 de ani o gravidă are doar un risc de 1-2% de a naşte un copil cu sindrom Down (este drept, mult mai mare decât la 25 de ani), deci un risc relativ mic şi acceptabil, mai ales în condiţiile existenţei diagnosticului prenatal;
(2) În ciuda cercetărilor intense, nu există nici-o dovadă ştiinţifică care să susţină rolul posibil al unor factori externi: infecţii virale, radiaţii, medicamente, hormoni, contraceptive, cafeaua sau fumatul, reducerea frecvenţei raporturilor sexuale etc. De aceea în practica sfatului genetic rolul invocat de altii al acestor factori trebuie cel putin...temperat.
(3) La om, nu există probabil factori genetici care să crească riscul de nedisjuncţie); pentru aceasta pledează riscul de recurenţă mic (1%) pentru un al doilea copil afectat (atenţie: la acest risc trebuie adăugat riscul dependent de vârsta maternă). Totuşi nu trebuie să uităm că la alte specii nedisjuncţia este sub control genetic iar diferiţi cromosomi au rate diferite de trisomie în avorturile spontane (de exemplu, trisomia 16 reprezintă o treime din aceste avorturi). Oricum, controlul genetic al meiozei este încă departe de a fi elucidat

2. FECUNDAREA

Prin fecundare se înţelege unirea celor doi gameţi, ovulul şi spermatozoidul, şi formarea zigotului (celula ou), din care se va dezvolta un nou organism. În felul acesta, părinţii transmit, prin gameţi, „zestrea" lor ereditară viitorilor descendenţi.

Fecundarea este un fenomen complex, cu anumite caracteristici; dintre acestea vom reţine, pentru cadrul discuţiei noastre, faptul că la om fecundarea este *monospermică*: pătrunderea unui singur spermatozoid în ovul determină o serie de evenimente biochimice ce împiedică intrarea altor spermatozoizi. Concomitent, aparatul mitotic al ovocitului (situat la periferie) este brusc activat şi se finalizează meioza II, eliminându-se al doilea globul polar. Setul de cromosomi ce ramâne în ovocit formează *pronucleul feminin*. În citoplasma ovulului, spermatozoidul suferă o serie de

[29] S-a discutat şi reducerea competenţei „imunologice" dintre mamă şi făt odată cu creştere vârstei materne, fapt ca ar permite supravieţuira embrionilor trisomici; lipsesc probe pentru această ipoteză.

modificări (coada şi piesa intermediară, ce are câteva mitocondrii, sunt dezintegrate) iar nucleul său devine *pronucleul masculin.* Cei doi pronuclei se aproprie unul de altul, cromosomii lor se replică sincron şi, după ruperea membranelor nucleare, se fixează pe fibrele primului fus de diviziune; zigotul se divide şi formează primele două celule fiice diploide.

În cursul fecundării au loc mai multe evenimente genetice. În primul rând, prin fuziunea celor doi gameţi haploizi (n=23) *se reface numărul diploid de cromosomi,* caracteristic speciei umane (2n=46). Începând cu zigotul toate celulele somatice vor avea cromosomii în perechi de omologi, identici ca morfologie şi structură genetică dar diferiţi ca origine. În momentul fecundării, genele parentale din cromosomii gameţilor formează o structură nouă, total diferită de a părinţilor, unică şi constantă; ea determină *individualitatea genetică* a organismului. Contribuţia părinţilor la ereditatea copiilor nu este perfect egală deoarece ADN mitocondrial provine exclusiv de la mama, prin mitocondriile din citoplasma ovulului.

În al doilea rând, în momentul fecundării *se stabileşte sexul genetic* XX sau XY al viitorului organism, prin asortarea cromosomilor sexuali din gameţi. Întrucât la mamifere şi om sexul masculin este heterogametic, el va produce două tipuri de spermatozoizi cu X şi cu Y, care fecundând un ovul cu Y vor realiza sexul genetic XX şi respectiv XY. Aşa cum am arătat, numărul foarte mare de spermatozoizi lansat în cursul unui raport sexual fecundant asigură condiţiile statistice care oferă celor două tipuri de spermatozoizi şanse egale de fecundare; de aceea raportul sexelor la naştere este aproape 1:1.

> În realitate, studiile sexului genetic la fetuşi au arătat o uşoară predominenţă a sexului masculin (120 fetuşi masculini la 100 feminini, deci 54,5%); o explicaţie posibilă ar fi mobilitatea mai mare a spermatozoizilor cu Y, care ajung mai frecvent la „ţintă". Diferenţele se mai reduc la naştere (51,5%) şi se pare că se anulează la pubertate, pentru ca în a treia decadă de viaţă raportul să fie favorabil sexului feminin. Această „dinamică" nu este clar explicată; o ipoteză susţine că sexul feminin este „mai rezistent" la agresiunile externe deoarece are un cromosom X în plus, care nu ar fi total inactivat (conform ipotezei Lyon) (vezi capitolele 2.D.2.2 şi 4.B.4.a).

În cursul fecundării se pot produce o serie de devieri de la mecanismul sau rezultatul procesului normal de fecundare. Există astfel posibilitatea rară a unei **duble fecundări** atunci când ovarul eliberează în momentul ovulaţiei două ovule. Prin fecundarea lor individuală se vor forma doi gameţi; ei pot evolua separat, independent unul de altul, formând *gemenii dizigoţi* sau se pot uni într-o singură masă embrionară ce va produce un singur individ cu două componente genetice distincte ca origine (*„doi indivizi într-unul singur"*), numit *himeră* (după monstrul din mitologia greacă care avea cap de leu, corp de capră şi coadă de balaur). În ultimul caz, dacă zigoţii vor avea acelaşi sex genetic se realizează o sexualizare normală şi numai studiul unor caractere ereditare normale (grupe sanguine, serice etc) va evidenţia existenţa unei duble populaţii celulare[30]. Dacă zigoţii care s-au unit aveau sexe genetice diferite, se realizează o constituţie genetică XX/XY care va produce o tulburare de sexualizare, numită hermafroditism adevărat.

O altă anomalie de fecundare este *dispermia*, situaţia foarte rară în care un ovul este fecundat de către doi spermatozoizi. Rezultă un zigot triploid (3n). Acelaşi rezultat poate fi obţinut atunci când unul din gameţi este diploid (*diginie* sau *diandrie*) (vezi capitolul 6.B.1). Evoluţia unui zigot triploid va depinde de originea setului haploid suplimentar: dacă este de provenienţă maternă (diginie) atunci dezvoltarea embrionară este sever întârziată, placenta este mică şi fibrotică iar embrionul este avortat precoce; dacă este de origine paternă (diandrie) se va forma o placentă anormală, mare şi polichistică, cu un embrion slab dezvoltat (*molă hidatiformă parţială*)

Vom menţiona în sfârşit situaţia în care un spermatozoid 23,X fecundează un ovul fără nucleu şi setul de cromosomi al spermatozoidului se dublează formînd un zigot 46,XX în care toţi cromosomii sunt de origine paternă şi toate genele alele vor fi homozigote; se produce o dezvoltare anormală a trofoblastului şi dezorganizarea/absenţa embrionului numită *mola hidatiformă completă.* Există şi situaţia inversă, în care celule 46,XX conţin numai cromosomi materni; ele proliferează şi produc un teratom ovarian (alcătuit din celule embrionare dar nu şi din ţesut placentar). Din cele două situaţii prezentate mai sus rezultă că dezvoltarea fetală normală necesită ambele contribuţii genetice, maternă şi paternă.

[30] Himera se deosebeşte de *mozaic* deoarece populaţiile (clonele) celulare diferite au origini diferite; în mozaicuri, clonele celulare anormale au origine comună cu cele normale, provin din acelaşi zigot.

D. EREDITATEA MONOGENICĂ

1. LEGILE LUI MENDEL.

Transmiterea caracterelor ereditare de la părinţi la copii a fost remarcată din cele mai vechi timpuri. Dar explicaţiile date similitudinii familiale şi încercările de a stabili legile eredităţii au cunoscut numeroase eşecuri. Ele erau generate de ipoteza greşită a *"amestecării caracterelor ereditare"*. Potrivit aceastei ipoteze, descendenţii prezintă un amestec al caracterelor parentale; ele îşi pierd identitatea şi nu se vor mai regăsi ca atare în generaţiile următoare.

Pe baza unor cercetări experimentale de mare fineţe şi precizie, Gr. Mendel a demonstrat (1865) că la urmaşi nu se produce nici un amestec al caracterelor parentale; unele caractere nu se exprimă în prima generaţie filială dar pot apărea neschimbate ulterior. Pentru a explica aceste fenomene, Mendel a presupus că fiecare caracter este determinat de *o pereche de factori ereditari* (numiţi mai târziu „gene"), care în momentul formării gameţilor se separă, *segregă,* distribuindu-se la întâmplare în celulele sexuale. Mendel a observat că transmiterea caracterelor ereditare este un proces statistic ce poate fi descris în termeni de probabilitate, şi a formulat legile care guvernează acest proces: *legea segregării şi legea asortării independente*; ele stau la baza geneticii ca ştiinţă.

Cercetările şi rezultatele obţinute de Mendel au fost ignorate de către contemporanii săi "nepregătiţi" pentru a le înţelege. În anul 1900 principiile stabilite de Mendel au fost *redescoperite* simultan în trei laboratoare, demonstrându-se că legile eredităţii ar fi fost descoperite, la un anumit nivel al dezvoltării cunoştinţelor, chiar şi....în absenţa lui Mendel, deoarece *legile eredităţii sunt legi obiective*. Doi ani mai târziu, Sutton, pornind de la ipoteza (plauzibilă) că materialul ereditar se găseşte în cromosomi, stabileşte o corelaţie strânsă între comportamentul cromosomilor în meioză şi principiile enunţate de Mendel, formulând **"teoria cromosomică a eredităţii".** În acelaşi an (1902), un medic englez, sir A.Garrod, a raportat primul exemplu de ereditate mendeliană la om – *alcaptonuria* – o anomalie biochimică congenitală, transmisă ereditar, recesiv. Ulterior el a studiat şi alte boli ereditare (albinismul, cistinuria şi pentozuria), veritabile *"erori înnăscute de metabolism",* şi a pus astfel bazele geneticii medicale.

Datele acumulate de genetica secolului XX au demonstrat *universalitatea* legilor lui Mendel. Numeroase caractere umane normale sau anormale, determinate monogenic, se transmit în concordanţă cu aceste legi. „*Dacă Mendel ar fi trăit în epoca noastră, i-ar fi fost probabil mult mai uşor să descopere legile geneticii studiind ereditatea familiilor umane"* (Ch. Salmon, 1973).

Dezvoltarea geneticii moleculare a modificat în mare măsură "mendelismul clasic" mai ales prin înţelegerea modului de exprimare a genei şi a interacţiunilor complexe dintre gene. *"Nu este vorba de o răsturnare a principiilor care guvernează transmiterea mendeliană, ci numai de o dezvoltare a lor"* (Hull, 1978).

1.1. PRIMA LEGE A LUI MENDEL: LEGEA SEGREGĂRII

Prima lege a lui Mendel sau legea segregării[31] a fost stabilită şi poate fi demonstrată prin urmărirea rezultatelor încrucişărilor între indivizi care diferă printr-un singur caracter (monohibridare), sau - mai exact - printr-un cuplu de caractere alternante sau contrastante.

Vom analiza un exemplu concret. După capacitatea de a simţi gustul amar al feniltiocarbamidei (PTC) sau al feniltioureei, circa 70% din populaţie este alcătuită de "*gustători*" şi 30% din "*negustători*". Din căsătoria unui gustător cu un negustător (generaţia P sau parentală) rezultă în F1 (prima generaţie filială) numai descendenţi gustători (100%); încrucişarea lor va produce în F2 atât gustători cât şi negustători. Caracterul parental gustător care se manifestă în F1 şi F2 este **dominant** iar cel negustător, care apare numai în F2, se numeşte **recesiv**. Cumulând mai multe observaţii familiale şi calculând proporţia celor două fenotipuri, se obţine în F2 un rezultat egal sau vecin cu 3:1.

Persoanele negustătoare din F2, prin încrucişare cu indivizi asemănători lor, vor da numai

[31] Se mai numeşte legea disjuncţiei caracterelor parentale sau legea purităţii gameţilor.

descendenţi negustători. În schimb, din încrucişarea gustătorilor din F2 cu negustători[32] rezultă, în circa 1/3 din cazuri, numai gustători iar în restul de 2/3 apar în proporţii egale gustători şi negustători; acest lucru ne arată că deşi fenotipic gustătorii din F2 sunt identici, genotipic ei sunt diferiţi. Ţinând cont de această diferenţă şi de raporturile procentuale, rezultă că indivizii din F2 aparţin fenotipic la două categorii, în proporţie de 3 : 1, iar genotipic ei alcătuiesc trei grupe, în raportul de 1 : 2 : 1.

Pe baza acestui exemplu se poate realiza un model general valabil al transmiterii caracterelor în monohibridări. El va fi interpretat în spiritul gândirii mendeliene, folosind însă noţiunile şi cunoştinţele acumulate ulterior de genetica clasică şi în special cele despre cromosomi şi dinamica lor în meioză.

Mendel a presupus că orice individ rezultat prin unirea celor două tipuri de gameţi parentali primeşte material genetic de la *ambii părinţi*. De aceea, fiecare caracter este determinat de o pereche de "factori ereditari" (termenul îi aparţine lui Mendel) sau gene alele (ce ocupă acelaşi locus pe cromosomii omologi). Organismele din generaţia parentală (P) sunt "*pure*" din punct de vedere genetic, au genele alele identice, sunt homozigote: *A/A* şi *a/a*. În anafaza meiozei I *genele alele segregă* şi gameţii (haploizi) conţin un singur "factor ereditar" sau genă: (*A*) şi (*a*); deci homozigoţii sunt homogametici. Prin fecundarea acestor gameţi rezultă un zigot (diploid) în care factorii ereditari materni şi paterni *se asociază* alcătuind genotipul *A/a* al tuturor descendenţilor hibrizi din F_1. Ambii părinţi contribuie *în mod egal* la ereditarea copiilor (tabelul 5.3).

Tabelul 5.3 Monohibridarea şi legea I a lui Mendel

Generaţie	Fenotipuri	Genotipuri	
P	**A** x **a**	*A/A* *x* *a/a* *(A)* *(a)*	**homozigoţi** **gameţi**
F_1	**A** (100%)	*A/a*	**heterozigoţi**
Încrucişare indivizi F_1	**A** x **A**	*A/a* *x* *A/a* *(A) şi (a)* *(A) şi (a)*	**heterozigoţi** **gameţi**
F_2	**A** şi **a** (75%) (25%)	*A/A* *A/a* *a/a* (25% 50%) 25%	
Retroîncrucişare **F_1** x **$P_{(recesiv)}$**	**$A_{(F1)}$** x a	*A/a* *x* *a/a* *(A) şi (a)* *(a)*	**gameţi**
	A şi **a** (50%) (50%)	*A/a* *a/a*	
Retroîncrucişare **F_2** x **$P_{(recesiv)}$**	(1/3) **$A_{(F2)}$** x a	*A/A* *x* *a/a* *(A)* *(a)*	**gameţi**
	A (100%)	*A/a*	
	(2/3) **$A_{(F2)}$** x **a**	*A/a* *x* *a/a* *(A) şi (a)* *(a)*	**gameţi**
	A şi **a** (50%) (50%)	*A/a* *a/a*	

Descendenţii din F_1 au gene alele diferite, sunt heterozigoţi. Întrucât au un genotip identic (*A/a*), toţi indivizii (hibrizi) din prima generaţie filială sunt fenotipic identici, uniformi. Aceasta este o regulă generală denumită *"principiul uniformităţii hibrizilor din F_1"* (după unii este "prima" lege a lui Mendel): când se încrucişează indivizi homozigoţi ("puri") ce diferă printr-un caracter particular, descendenţii lor (F_1) sunt uniformi.

[32] Negustătorul este asimilat tipului parental şi atunci încrucişarea F_2 (sau F_1) x P se numeşte retroîncrucişare.

Să analizăm acum încrucişările dintre indivizii din generaţia F_1. În F_2 se obţin fenotipic două tipuri de urmaşi: unii dintre ei se aseamănă cu fenotipul dominant din P şi F_1, iar alţii cu fenotipul recesiv din P. Proporţia lor este de 3 dominanţi la 1 recesiv. Se observă că în F_2, alături de caracterul dominant reapare caracterul parental recesiv, care nu s-a exprimat în prima generaţie filială, deşi gena corespunzătoare (*a*) era prezentă (*A/a*). Rezultă că factorii ereditari sau genele care determină caracterul recesiv *îşi menţin neschimbată identitatea lor*, chiar dacă nu se manifestă fenotipic în F_1. Ele nu se "contaminează", nu „se amestecă" (aşa cum se credea înainte de Mendel), rămân neschimbate, constante şi riguros "pure". Gena recesivă devine manifestă în momentul în care (în F_2) se realizează starea homozigotă (*a/a*). *"Un caracter recesiv circulă de-a lungul generaţiilor ca un râu subteran, care reapare din timp în timp, atunci când se produce confluenţa a două din braţele sale"* (Ph. Sentis).

Prin studiul descendenţilor F_3 (sau prin retroîncrucişare F_2 x $P_{recesiv}$) s-a demonstrat că în F_2 au rezultat în realitate trei tipuri de descendenţi: ¼ seamănă cu părintele dominant, ½ sunt hibrizi ca şi indivizii din F_1 şi ¼ erau puri şi asemănători părintelui recesiv. Acest raport genotipic 1:2:1 în F_2 indică faptul că jumătate din gamaţii unei persoane F_1 poartă gena dominantă iar cealaltă jumătate - pe cea recesivă. Această concluzie a fost capitală pentru Mendel, căci ea i-a permis să înţeleagă mecanismul transmiterii genetice şi să formuleze **legea segregării**:

- *orice individ primeşte, în mod egal, material genetic (gene) de la ambii părinţi;*
- *genele parentale se separă (segregă) atunci când acel individ produce la rândul său gameţi;*
- *gameţii vor fi "puri" genetic (au o singură genă din perechea de alele);*
- *prin combinarea întâmplătoare a gameţilor, în F_2 se produce o separare, o disjuncţie, a caracterelor parentale, în proporţia de 3 dominanţi la 1 recesiv.*

Legea segregării se explică astăzi perfect prin dinamica cromosomilor omologi în meioza primară (tabelul 5.3): ei se separă (disjuncţie) şi merg în celule distincte. Heterozigoţii (*A/a*) din F_1 produc două tipuri de gameţi (*A*) şi (*a*). Fiecare genă alelă din genotipul *A/a* are o probabilitate egală de a se transmite şi de a se găsi în gameţi, indiferent dacă este dominantă sau recesivă. Cele două tipuri de gameţi se produc în cantităţi statistic egale. Fiecare gamet are, de asemenea, o probabilitate egală de a se combina (fecunda) cu ceilalţi. Prin întâlnirea lor întâmplătoare pot rezulta în F_2 trei tipuri de indivizi cu genotipurile A/A, A/a, a/a în proporţie de 1 : 2 : 1. În funcţie de raporturile de dominanţă /recesivitate dintre gene vor rezulta proporţiile fenotipice de 3 dominaţi : 1 recesiv.

Menţionăm, în finalul acestei discuţii, că acţiunea genei este independentă de originea sa maternă sau paternă. Când se formează un zigot, genele "par a uita" originea lor parentală.

1.2. A DOUA LEGE A LUI MENDEL: LEGEA ASORTĂRII INDEPENDENTE

A doua lege a lui Mendel sau *legea asortării independente*[33] poate fi demonstrată prin încrucişări între organisme ce se deosebesc prin două (dihibridare) sau mai multe cupluri de caractere. Ele *se transmit independent* unul de altul: ereditatea primului caracter nu influenţează ereditatea celui de al doilea. Explicaţia acestui fenomen rezidă în faptul că genele ce determină aceste caractere sunt *neînlănţuite*, situate pe cromosomi omologi diferiţi si independente una faţă de alta; ele *se pot combina liber* între ele, dând genotipuri şi fenotipuri noi.

De exemplu: încrucişarea dintre o persoană "gustător şi cu grup sanguin A" cu alta "negustător şi cu grup sanguin 0", va produce în generaţia F_1 *numai* indivizi "gustători, cu grup sanguin A" (caractere dominante) (tabelul 5.4). Din încrucişarea lor rezultă în F_2 patru tipuri de descendenţi: gustători – grup A; gustători – grup 0; negustători – grup A; negustători – grup 0, în proporţie de 9 : 3 : 3 : 1. Prima remarcă pe care o putem face în acest caz se referă la reapariţia în F_2 a tipului parental recesiv: negustător – grup 0: Se remarcă apoi că în F_2 apar, alături de fenotipurile parentale, două *fenotipuri noi* ce rezultă prin *recombinarea* caracterelor din generaţia P. Explicaţia acestor fenomene este astăzi simplă, întrucât cunoaştem structura şi funcţia genelor, precum şi dinamica cromosomilor în meioză (anafaza I).

---

[33] Se mai numeşte şi legea liberei combinaţii a factorilor ereditari sau "legea segregării independente a perechilor de caractere".

Tabelul 5.4. Dihibridarea şi legea a II-a a lui Mendel

GENERAŢIE				
P	fenotip:	GUSTĂTOR; GRUP SANGUIN A	x	negustător; grup sanguin 0
	genotip:	*G/G ; A/A*		*g/g; o/o*
	gameţi:	(*G ; A*)	x	(*g ; o*)
F_1		GUSTĂTORI; GRUP SANGUIN A. (100%)		

F_1 x F_1 fenotip: GUSTĂTOR ; GRUP SANGUIN A x GUSTĂTOR ; GRUP SANGUIN 0

genotip: *G/g ; A/o* *G/g ; A/o*

Combinaţii fenotipice

gameţi	G ; A	G ; o	G ; A	G ; o
G ; A	*G/G ; A/A*	*G/G ; A/o*	*G/g ; A/A*	*G/g ; A/o*
G ; 0	*G/G ; A/o*	*G/G ; o/o*	*G/g ; A/o*	*G/g ; o/o*
g ; A	*G/g ; A/A*	*G/g ; A/o*	*g/g ; A/A*	*g/g ; A/o*
g ; 0	*G/g ; A/o*	*G/g ; o/o*	*g/g ; A/o*	*g/g ; o/o*

F_2 Combinaţii parentale → Combinaţii noi

GUSTĂTORI ;	GRUP SANGUIN A	9
GUSTĂTORI ;	grup sanguin 0	3
negustători ;	GRUP SANGUIN A	3
negustători ;	grup sanguin 0	1

	GUSTĂTORI		Negustători	
GRUP SANGUIN A	9		3	12
grup sanguin 0	3		1	4
	12		4	

Organismele parentale diferă prin două caractere distincte, determinate de gene situate pe cromosomi diferiţi (*neînlănţuite*). Aceste organisme sunt *homozigote*, întrucât genele alele sunt identice: (*G/G; A/A*) şi (*g/g* şi *0/0*). Ele vor forma fiecare un singur tip de gameţi (*G;A*) şi (*g;o*), care - după fecundare - vor da prima generaţie filială (F_1) de indivizi "uniformi" fenotipic şi dublu heterozigoţi (*G/g; A/o*); caracterul "gustător – grup A" este dominant. Prin încrucişarea acestor persoane F_1 între ele, rezultă patru fenotipuri diferite, deoarece în momentul în care se formează gameţii, genele ce alcătuiesc cele două perechi de alele (*G/g*) şi (*A/o*), segregă (se separă) şi se asortează independent una de alta, întocmai ca şi cromosomii omologi în anafaza meiozei primare. Fiecare persoană F_1 formează patru tipuri de gameţi: *GA; Go; gA; go* – care, prin fecundare *întâmplătoare*, vor da 16 genotipuri (de 9 feluri) (tabelul 5.4). Deoarece genele *G* şi *A* sunt dominante faţă de *g* şi *o*, rezultă numai patru categorii fenotipice parentale, în proporţie de 9:3:3:1; două sunt identice cu fenotipurile parentale, celelalte două sunt noi şi rezultă prin recombinarea lor. Apariţia acestor combinaţii noi pledează pentru faptul că asortarea genelor în gameţi este un proces în întregime întâmplător. Remarcăm faptul că fiecare caracter, luat separat, segregă independent de celălalt, realizând raportul specific pentru monohibridare de 3 : 1 (12 gustători : 4 negustători şi 12 grup A : 4 grup 0).

Legea a doua a lui Mendel sau **legea asortării independente** (sau a liberei combinaţii a factorilor ereditari) afirmă faptul că:

- *genele ce determină un caracter segregă independent de genele ce determină alt caracter;*

- *genele ce alcătuiesc diferite perechi de alele (A/a; B/b; ş.a.m.d.) se asortează (se combină) independent una de alta, atunci când se formează gameţi;*
- *în cazul a două perechi de caractere, raportul de segregare fenotipică în F2 este 9 : 3 : 3 : 1*

La baza acestei legi stă fenomenul de asortare independentă a cromosomilor din perechile de omologi, ce are loc în cursul anafazei meiozei primare (recombinare cromosomică).

Legea a doua a lui Mendel poate fi demonstrată şi în cazul încrucişărilor între indivizi ce diferă prin 3, 4 … n cupluri de alele independente, distincte. Numărul şi diversitatea genotipurilor şi fenotipurilor care rezultă (admiţând că există o dominantă totală a unei alele asupra celeilalte) poate fi calculat conform tabelului 5.5

Tabelul 5.5 Diversitatea fenotipurilor şi genotipurilor ce rezultă din încrucişările între heterozigoţi pentru 1, 2, 3 … n cupluri de alele independente (după Bocque, 1974)

Număr de cupluri alele independente	Număr de categorii genotipice	Proporţii a diferitelor fenotipuri	Număr de categorii genotipice
1 (monohibridere)	$2^1 = 2$	$(3:1)^1$	$3^1 = 3$
2 (hibridare)	$2^2 = 4$	$(3:1)^2$	$3^2 = 9$
3 (trihibridare)	$2^3 = 8$	$(3:1)^3$	$3^3 = 27$
4 (tetrahibridare)	$2^4 = 16$	$(3:1)^4$	$3^4 = 81$
n	2^n	$(3:1)^n$	3^n

Numărul tipurilor de gameţi formaţi de fiecare sex este egal cu numărul categoriilor fenotipice indicate. La om, pentru n = 23, descendenţa posibilă între heterozigoţi numai pentru *o singură pereche de alele pe fiecare din cele 23 perechi cromosomi* ar fi 2^{23} = 8 398 608 categorii fenotipice şi 3^{23} = 94 143 178 827 categorii genotipice. Acest număr enorm de combinaţii teoretic posibile la descenţi, ne arată de ce fiinţele umane sunt practic unice, genotipic şi fenotipic.

2. TRANSMITEREA CARACTERELOR MONOGENICE

2.1. DATE GENERALE

Caracterele monogenice sunt cele mai simple caractere genetice a căror prezenţă sau absenţă depinde de alelele, normale sau mutante, ale *unui singur locus*, situat pe autosomi sau pe cromosomul X. Desigur, manifestarea caracterului poate depinde şi de alţi factori, genetici sau de mediu, dar genele respective sunt *necesare şi suficiente* pentru exprimarea caracterului. Ele au *efecte mari* şi se conformează în mod obişnuit principiului "o genă → o proteină → un caracter", deşi, după cum ştim deja, mutaţii diferite în aceeaşi genă pot produce fenotipuri (boli) diferite sau, invers, mutaţii în gene diferite se pot manifesta fenotipic identic (vezi heterogenitatea genetică, capitolul 4.A). Aceste caractere monogenice se moştenesc de obicei într-un mod simplu, identic sau similar cu cel descris de către Mendel; de aceea ele se numesc şi caractere mendeliene.

Se cunosc peste 10.000 de caractere mendeliene, normale sau patologice, listate în lucrarea de referinţă a lui Victor McKusick *Mendelian Inheritance of Man* (ed.12, 1998), indispensabilă medicilor geneticieni. Versiunea online, numită *OMIM* este continuu actualizată şi disponibilă prin internet (caseta 5.4)

CASETA 5.4

OMIM

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) este un catalog al genelor şi bolilor genetice care se transmit mendelian, accesibil prin Internet la adresa de web: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/OMIM. OMIM este bazat pe textul celebrului catalog "Mendelian Inheritance in Man" care a fost elaborat în 1966 sub conducerea profesorului Victor McKusick de la Universitatea Johns Hopkins din Baltimore şi se află în prezent la ediţia a 12-a

(1998). Spre deosebire de forma publicată care apare periodic, varianta online este actualizată zilnic. Astfel, la 1Martie 2003, numărul total de intrări era de 14231, număr care include atât fenotipuri pentru care sunt identificate genele cauzatoare, cât şi descripţii fenotipice fără loci identificaţi sau loci fără fenotip asociat.

Numărul de intrări OMIM la 21 februarie 2003

	Autosomale	***Legate de X***	***Legate de Y***	***Mitocondriale***	***Total***
*Gene localizate sau fenotipuri cu loci precizaţi (prefix *)*	*9956*	*541*	*41*	*37*	*10574*
Fenotipuri cu doi sau mai multi loci asociaţi (prefix #)	*1120*	*94*	*0*	*23*	*1237*
Alţi loci sau fenotipuri (fără prefix)	*2260*	*158*	*2*	*0*	*2419*
Total	*13335*	*793*	*43*	*60*	*14231*

** Un asterisc prezent înaintea unei intrări semnifică un fenotip determinat de gena situată la locusul precizat şi faptul că modul de transmitere a fenotipului a fost demonstrat, după aprecierea autorilor şi editorilor.*
 # Acest simbol înaintea unei intrări înseamnă că acest fenotip poate fi cauzat de mutaţii la nivelul a două sau mai multe gene.

Fiecare intrare are un numar unic din şase cifre. Prima cifră corespunde modului de transmitere a genei asociate: 1 – boli (sau loci) cu transmitere autosomal dominantă desemnate înainte de 15 mai 1994; 2 – boli (sau loci) cu transmitere autosomal recesivă stabilite înainte de 1994; 3 – boli (sau loci) legate de X; 4 – boli (sau loci) legate de Y; 5 – boli (sau loci) mitocondriale; 6 – boli (sau loci) autosomale desemnate după 15 mai 1994. Dupa cum se observă, după 1994 s-a renunţat la clasificarea genelor autosomale în dominante sau recesive deoarece unele gene pot avea mutaţii diferite cu transmiteri diferite. Variantele alelice ale unui locus sunt desemnate prin numere zecimale alcătuite din 4 cifre care urmează dupa codul de şase cifre. De exemplu, variantele alelice (mutaţiile) genei pentru factorul IX al coagulării sunt desemnate prin 306900.0001 până la 306900.0101. Locusul pentru beta-globina (HBB) este numerotat 141900, iar hemoglobina S (implicata in producerea sicklemiei) este numerotata 141900.0243.

Bolile monogenice sunt caracterizate prin *modul lor de transmitere în familie*, stabilit în urma unei anamneze (istoric) familiale şi reprezentat grafic (cu ajutorul unor simboluri standard), sub forma unui arbore genealogic (în engleză *pedigree*[34]) (figura 5.21).

Asupra acestei acţiuni, importante în diagnosticul bolilor genetice, ne vom referi cu detalii mai târziu (vezi capitolul 9.A), dar acum vom introduce câţiva termeni de bază, pentru a facilita discuţiile privind transmiterea genealogică. Persoana afectată (■ sau ●) de la care începe recenzarea unei familii cu o boală genetică se numeşte **proband** (*caz index* sau *propositus/proposita*, în funcţie de sex) iar aceea care consultă medicul (rudă sănătoasă sau afectată cu probandul) se numeşte **consultand**. Relaţiile intrafamiliale şi gradele de rudenie sunt redate în figura 5.22. Poziţia unei persoane în arbore este indicată prin *numere romane* pentru generaţie şi *numere arabe* pentru locul unui individ într-o generaţie.

Modelul de transmitere ereditară a unui caracter monogenic în familie depinde de doi factori:

- *localizarea* genei pe un autosom **(**caracter autosomal) sau pe cromosomii sexuali, X sau Y (caracter legat de X sau de Y);
- *fenotipul* dominant sau recesiv determinat de genă.

Astfel există cinci modele de bază pentru transmiterea monogenică: autosomal dominant (AD), autosomal recesiv (AR), recesiv-legat de X (RLX), dominant-legat de X (DLX) şi legat de Y (LY).

[34] „Pedigree" derivă din expresia franceză *„pied de grue"* (picior de cocor) care exprimă aspectul ramificat al diagramei

Anamneza familială poate indica şi alte modele de trnsnmitere, nemendeliene (de exemplu transmiterea maternală în bolile mitocondriale), dar la acestea ne vom referi distinct, ulterior.

Înainte de a descrie caracteristicile modelelor de transmitere monogenică sunt utile câteva consideraţii.

(1). Distincţia dintre ereditatea autosomală şi legată de X sau Y este evidentă dar trebuie subliniat că bărbaţii XY au un singur cromosom X şi deci nu sunt niciodată homozigoţi sau heterozigoţi pentru genele localizate pe cromosomii sexuali, ci numai *hemizigoţi*. De asemenea, între genele situate pe cei doi X, la femeile XX, şi genele de pe o pereche de autosomi apar diferenţe, deoarece ambele alele autosomale sunt *active* (exceptând fenomenul de amprentare, la care ne vom referi mai târziu) dar genele de pe X, deşi se găsesc în „doză dublă", în marea lor majoritate sunt exprimate *numai* de pe unul din cei doi cromosomi X, celălalt fiind inactivat.

(2). Deşi există caractere determinate de gene/loci situate pe Y ele sunt foarte probabil neesenţiale pentru sănătate, deoarece femeile XX sunt perfect normale; aceste gene sunt implicate, în marea lor majoritate[35], numai în funcţiile sexuale, specific masculine, iar mutaţiile lor afectează numai aceste funcţii. Deci foarte probabil (exceptând bolile corelate cu funcţia sexuală masculină) la om nu există alte boli legate de Y

(3). Termenii de dominant şi recesiv sunt proprietăţi ale caracterelor şi nu ale genelor; ei se referă mai ales la fenotipul clinic, deşi descriptiv, sintetic, se folosesc termenii de alelă dominantă sau recesivă[36]. Clasic, *distincţia dintre dominant şi recesiv se realizează la heterozigoţi*: caracterele dominante se manifestă la heterozigoţi iar cele recesive nu se manifestă la heterozigoţi, ci numai la homozigoţi (sau heterozigoţi compuşi). Evident, la bărbaţii hemizigoţi pentru loci de pe X sau Y nu se pune problema de dominant sau recesiv. Diferenţa dintre ereditatea dominantă şi recesivă nu este absolută ci relativă (arbitrară) deoarece în multe boli recesive heterozigoţii au manifestări ale ambelor gene la nivel molecular/biochimic, celular şi uneori (în anumite condiţii) şi la nivel clinic. Să ne reamintim că *sicklemia* (vezi capitolul 4.B.1) este o afecţiune recesivă deoarece numai homozigoţii (*a/a)* manifestă obişnuit boala; heterozigoţii (*N/a*) prezintă însă *trăsătura sicklemică* deoarece produc atât HbA cât şi HbS, iar în anumite condiţii (scăderea concentraţiei de oxigen) pot manifesta şi semne clinice. Mai mult, mutaţii diferite în aceeaşi genă autosomală (de exemplu, gena pentru hormonul de creştere) se pot transmite ereditar diferit, unele dominant altele recesiv.

> *Deficienţa familială izolată de hormon de creştere* (IGHD) – manifestată prin hipostatură severă – este produsă prin mutaţii diferite în gena hormonului de creştere (*GH1*) situată pe cromosomul 17. Formele recesive de IGHD sunt produse de mutaţii nonsens ce alterează structura produsului astfel că el nu poate fi secretat. La heterozigoţi, gena normală produce o cantitate de hormon de creştere redusă la jumătate dar suficientă pentru o talie cvasinormală; deficienţa se va manifesta numai la homozigoţi. În formele dominante de IGHD, la heterozigoţi, în alela mutantă se produce frecvent o mutaţie a situsului de clivare a intronului doi, care va deleta exonul trei al genei GH1; rezultă o proteină anormală, care se secretă (!); ea se combină (punţi disulfidice) cu proteina normală (codificată de alela normală), anulându-i efectele (*dominanţă negativă*) şi producând boala.

De aceea, în catalogul M.I.M, după anul 1994, caracterele autosomale au încetat să fie clasificate în dominante şi recesive.

În aceste condiţii se pune firesc întrebarea: *cum vom diferenţia caracterele şi genele dominante*? Distincţia este relativ simplă. Heterozigoţii cu o alelă normală şi alta mutantă vor avea doar jumătate din produsul normal al genei; dacă această jumătate este suficientă pentru realizarea funcţiilor genei, atunci alela mutantă este numită recesivă. Dacă acest lucru nu se întâmplă şi o alelă mutantă produce boala chiar dacă există o alelă normală, atunci alela mutantă este dominantă.

(4). Clasic, orice fenotip exprimat la heterozigoţi este definit ca dominant; această definiţie este prea rigidă deoarece în multe boli dominante homozigoţii (deşi foarte rari) sunt mai sever afectaţi decât heterozigoţii; pentru aceste cazuri, în care heterozigoţii au un fenotip intermediar între homozigoţii afectaţi şi cei normali, s-ar putea folosi termenii de *dominaţă incompletă* sau *semidominanţă* iar dacă ambele alele diferite se exprimă (de exemplu, în cazul alelelor HLA sau genelor A şi B pentru grupul sanguin ABO), termenul de *codominanţă***.** Totuşi, în cazul bolilor monogenice aceşti termeni sunt rar folosiţi.

---

[35] Excepţie fac genele „paseudoautosomale" care au alele funcţionale atât pe X cât şi pe Y

[36] Se recomandă ca alelele ce determină cracatere dominante să fie notate cu majuscule iar alelele ce determină caractere recesive cu litere mici. Noi preferăm simbolurile *A* sau *a*, pentru genele mutante şi *N* sau *n* pentru cele normale.

(5). Distincţia dintre dominant şi recesiv în cazul caracterelor/bolilor legate de X se estompează datorită fenomenului de inactivare (lyonizare) a unui cromosom X (inactivare precoce în viaţa embrionară, întâmplătoare şi definitivă). Într-adevăr, purtătoarele (heterozigotele X^a/X^N) pentru boli recesive legate de X manifestă adesea unele semne, atunci când sunt comparate cu bărbaţii XY afectaţi, iar heterozigotele pentru boli dominante legate de X sunt mai uşor şi variabil afectate. Explicaţia este deja cunoscută (vezi capitolele 2.D.2.b şi 4.B.4): o femeie heterozigotă pentru un caracter legat de X este un *mozaic* de celule care exprimă fie alela normală, fie alela anormală; în funcţie de proporţia şi localizarea celulelor cu X^a activ apar semne variate de boală.

(6). În sfârşit, vom sublinia faptul că, în practica medicală, modelul de transmitere ereditară a unei boli *poate fi rareori definit fără ambiguitate într-o singură familie*! Familiile umane au, deobicei, un număr limitat de membri, mai ales când apar şi copii afectaţi, iar multe afecţiuni genetice pot fi consecinţa unei mutaţii noi sau pot prezenta fenomenul de heterogenitate genetică. De aceea, determinarea modului de transmitere, deşi este foarte importantă pentru sfatul genetic, este cel mai adesea *o ipoteză de lucru* şi nu un fapt stabilit. Numai atunci când gena a fost clonată şi mutaţia cauzatoare de boală poate fi determinată prin analiza ADN este posibilă stabilirea certă a modului de transmitere a mutaţiei. În celelalte cazuri un diagnostic precis ne permite să consultăm *OMIM*, unde intrările cu un mod de transmitere ereditară bine stabilit sunt notate cu asterisc.

(7) Pentru înţelegerea termenilor ce vor fi folosiţi în analiza transmiterii monogenice este necesară cunoaşterea datelor esenţiale privind structura şi funcţia genei, prezentate în capitolele 3.A şi 4.A, precum şi a terminologiei de bază (locus, alelă; homozigot, heterozigot simplu, dublu şi compus; dominant, codominant şi recesiv; pleiotropie, penetranţă, expresivitate; heterogenitate genetică etc, pe care cititorul îi poate găsi definiţi şi în glosarul de la sfârşitul cărţii)

2.2 TRANSMITEREA AUTOSOMAL DOMINANTĂ

Mai mult de 50% din intrările incluse în OMIM reprezintă caractere transmise autsomal dominant (AD) iar bolile AD afectează, la diverse vârste, circa 20 din 1000 de nou născuţi. Multe dintre ele sunt frecvente şi serioase prin consecinţele lor: *hipercolesterolemia familială, boala polichistică renală-AD a adultului (ADPKD), neurofibromatoza 1, boala Huntington, polipoza adenoamtoasă familială, cancere ereditare de sân sau colon* etc.

a). Caracteristici şi criterii de transmitere AD

În această situaţie, caracterul este determinat de o pereche de gene alele, situată în loci omologi, pe unul dintre *autosomi*. Una din genele alele suferă o mutaţie (*A*) şi se manifestă fenotipic (clinic) la heterozigoţi (*A/n*), deoarece alela normală (*n*) este insuficientă pentru a compensa efectul alelei mutante. Cele două alele *A şi n* pot forma trei genotipuri: *A/n* (mai frecvent), *A/A* (mai rar) şi *n/n*; primele două genotipuri vor determina un fenotip anormal (o boală) autosomal dominantă, în care barbaţii şi femeile vor fi *egal afectaţi*.

Teoretic, cu cele trei genotipuri se pot realiza *şase* combinaţii sau tipuri de încrucişări (tabel 5.6), dar practic, frecvenţa lor într-o populaţie depinde de severitatea manifestării clinice, care determină sau nu supravieţuirea până la vârsta adultă şi capacitatea reproductivă (fertilitatea). Evident primele două combinaţii sunt cele mai frecvente, a treia este rară şi, împreună cu următoarele trei (rarisime), se întâlnesc în familiile mari, numai pentru boli „uşoare" (de exemplu, *brahidactilia, hemeralopia, prognatismul*) sau pentru cele cu debut tardiv (după 40 de ani).

Tabel 5.6. Transmiterea dominantă autosomală a unui caracter patologic. Sănătoşi (*n/n*) şi bolnavi (*A/A; A/n*)

Combinaţii genotipice parentale	Gameţi	Descendenţi	
		Genotipuri	Fenotipuri (*indiferent de sex*)
1. *n/n* + *n/n*	n x n	*n/n*	toţi sănătoşi
2. *A/n* + *n/n*	(A+n) x n	½ *A/n* ½ *n/n*	½ bolnavi ½ sănătoşi
3. *A/n* + *A/n*	(A+n) x (A+n)	¼ *A/A*; ½ *A/n*	¾ bolnavi

			¼ *n/n*	¼ sănătoşi (indiferent de sex)
4.	*A/A* + *n/n*	A x n	*A/n*	toţi bolnavi
5.	*A/A* + *A/n*	A x (A+n)	½ *A/A*; ½ *A/n*	toţi bolnavi
6.	*A/A* + *A/A*	A x A	*A/A*	toţi bolnavi

Din analiza acestor combinaţii / încrucişări rezultă o serie de caracteristici (reguli) ale transmiterii autosomal dominante.

Doi indivizi sănătoşi (n/n + n/n) nu pot avea copii cu afecţiuni AD; boala nu este transmisă prin persoane neafectate deoarece, teoretic, nu există purtători sănătoşi de genă mutantă. Această regulă are o excepţie: producerea unor mutaţii (AD) germinale noi (în gametogeneza unuia dintre părinţii sănătoşi) poate determina apariţia unui copil afectat; există de asemenea „abateri" determinate de heterogenitatea genetică de locus (mutaţii diferite, dominate şi recesive, pot da acelaşi fenotip; de exemplu în *retinita pigmentară*; vezi caseta 3.6) sau de genotipul unuia dintre părinţii sănătoşi care este în realitate *A/n* dar alela *A* nu se exprimă deloc fenotipic (non-penetranţă) sau se va exprima mai târziu decât la copilul afectat (anticipaţie). În acelaşi context se pot include şi cazurile de non-paternitate (în care tatăl nelegitim este *A/n*).

Din încrucişarea dintre un bolnav heterozigot (*A/n*) şi un sănătos (*n/n*) rezultă, teoretic, 50% bolnavi (*A/n*) şi 50% sănătoşi (*n/n*):

Bolnav (*A/n*)
↓
gameţi
A *n*

Sănătos → gameţi (*n/n*)

n	A/n	n/n
n	A/n	n/n

50% 50%

Rezultatul acestei încrucişări ne permite să formulăm alte reguli de bază ale transmiterii AD: fiecare bolnav are (cel puţin) un părinte afectat; cu alte cuvinte, *boala este prezentă în fiecare generaţie* şi în arborele genalogic al unei familii (suficient de mare) se observă o frecvenţă relativ ridicată a bolnavilor şi o *transmitere verticală* (figura 5.23). Aceste caracteristici, şi mai ales prezenţa, *continuitatea, bolii în succesiunea generaţiilor,* se observă frecvent în bolile AD mai putin severe, compatibile cu reproducerea şi, deseori, la cele cu debut tardiv.

Boala se manifestă (cu o frecvenţă şi o severitate relativ egală) atât la bărbaţi cât şi la femei iar gena mutantă (situată pe un autosom) poate fi moştenită şi transmisă cu o probabilitate egală de către ambele sexe (deci independentă de sex). Toate acestea pledează pentru o transmitere autosomală. În plus, *transmiterea tată → fiu este posibilă*; deşi acest criteriu nu este obligatoriu pentru transmiterea AD, prezenţa lui exclude alte tipuri de transmitere.

Evident, de la aceste reguli există şi excepţii, care complică interpretarea, şi pe care le vom discuta mai jos; este vorba de mutaţii noi, mozaicuri germinale, penetranţă redusă, anticipaţie, s.a.

Acum însă vom sublinia alt element important: fiecare bolnav, heterozigot (situaţia cea mai frecventă în bolile AD), are un risc de 50% de a avea descendenţi afectaţi, dacă gena are o penetranţă completă. Acest *risc de 50% este valabil la fiecare sarcină* (ca eveniment *independent*), indiferent dacă anterior s-a născut un copil normal sau afectat. Dar transmiterea gameţilor, la fel ca şi aruncarea unei monede, este supusă *fluctuaţiilor întâmplării* şi este posibil, spre exemplu, ca toţi copii (III-6, III-7, III-8, în figura 5.23) sau nici-unul dintre ei să fie afectaţi.

În transmiterea bolilor AD se poate întâlni uneori situaţia încrucişării dintre doi bolnavi heterozigoţi *A/n x A/n* (combinaţia 3 în tabelul 5.6) din care pot rezulta indivizi afectaţi şi homozigoţi (situaţiile 5 şi 6 din tabelul 5.6 sunt aproape numai teoretice). În multe boli AD (*hipercolesterolemia familială, acondroplazia, sindromul Marfan*, ş.a.) *homozigoţii sunt mai grav*

afectaţi decât heterozigoţii şi deseori prezintă forme letale, neonatal, de boală. Spre deosebire de aceste boli cu semidominanţă (*A/A > A/n > n/n*) există şi cazuri de boli cu dominanţă completă (în care *A/A = A/n*) iar exemplul cel mai cunoscut fiind cel al *bolii Huntington*. Revenind la situaţia rară a încrucişării dintre doi bolnavi heterozigoţi vom semnala, ca o caracteristică a bolilor dominante, faptul că ei pot avea descendenţi săntoşi care, în bolile AD, vor fi şi fete (!) şi băieţi.

Pe baza datelor discutate mai sus se pot formula următoarele *criterii privind transmiterea AD*:

- fiecare bolnav are de obicei un părinte afectat
- orice bolnav transmite boala la jumătate din copiii săi; riscul de 50% este valabil la fiecare sarcină;
- fenotipul anormal apare în fiecare generaţie (continuitate în succesiunea generaţiilor) iar în arborele genealogic se observă o transmitere verticală;
- indivizii sănătoşi nu transmit boala;

  Excepţiile de la aceste reguli sunt determinate de: penetranţa redusă, mutaţii noi sau mozaicuri germinale, debut tardiv de manifestare, non-paternitate şi, mai rar, heterogenitate genetică şi fenocopii;
- boala se manifestă (cu o frecvenţă şi o severitate relativ egală) atât la bărbaţi cât şi la femei iar gena mutantă poate fi moştenită şi transmisă cu o probabilitate egală de către ambele sexe (deci independentă de sex; excepţia o constituie bolile care predomină sau sunt limitate la un sex).
- transmiterea tată → fiu este posibilă şi caracteristică eredităţii AD.
- doi bolnavi (cu o afecţiune compatibilă cu supravieţuirea şi reproducerea) pot avea descendenţi sănătoşi, fete şi băieţi, iar dintre copii afectaţi o parte pot fi homozigoţi, cu o formă mai gravă de boală.

Pe lângă aceste criterii majore ale transmiterii AD, în arborii genealogici există şi alte indicii pentru acest mod de transmitere: frecvenţa crescută a bolnavilor sau absenţa legăturilor consanguine.

b). Excepţii de la regulile transmiterii AD.

(1). **Penetranţa redusă.** În bolile AD, mai ales cele cu pleiotropie şi expresivitate clinică variabilă (vezi capitolul 4. A), uneori un individ moşteneşte alela mutantă dar nu o manifestă fenotipic; el poate însă să o transmită la descendenţi, care pot să fie afectaţi (figura 5.24.a; la subiectul II.1 gena mutantă este *non-penetrantă*, nu se manifestă clinic dar se transmite). Se realizează astfel un „salt" peste generaţia parentală, aparent sănătoasă. Dacă o genă mutantă se manifestă la toţi heterozigoţii (*A/n*) atunci are o **penetranţă completă**; dacă manifestarea ei este sub 100% atunci gena mutantă are o **penetranţă redusă** sau incompletă.

Penetranţa se poate *măsura cantitativ* prin determinarea proporţiei heterozigoţilor (*A/n*) care exprimă fenotipic gena mutantă din totalul „purtătorilor obligatorii" de mutaţie. În exemplul din figura 5.24.A penetranţa este de ¾ deci 75% sau 0,75. Cunoaşterea penetranţei este importantă în sfatul genetic deoarece riscul unui bolnav cu o afecţiune AD cu penetranţă redusă (de exemplu, 0,75) de a avea copii afectaţi este mai mic de 0,5 (50%), fiind 0,5 x 0,75 = 0.37. În acest context, vom preciza, din nou, că este foarte important să facem diferenţa dintre o mutaţie cu penetranţă redusă (cu risc suficient de mare, chiar dacă este sub cel teoretic de 50%) şi o mutaţie nouă (cu risc mic de recurenţă); în acest scop vom folosi toate mijloacele posibile de diagnostic presimptomatic.

Penetranţa este o noţiune cantitativă (de tipul „tot sau nimic"), care se referă la expresia clinică a genei mutante (prezentă sau absentă), ce poate fi influenţată de diferiţi factori: metoda de diagnostic, vârsta de debut, sexul.

- *Metoda de diagnostic* este decisivă pentru a stabili dacă o genă se manifestă sau nu. De exemplu, *în boala polichistică renală a adultului (ADPKD)* o persoană tânără, ce a moştenit gena mutantă, poate să nu prezinte ecografic chisti renali vizibili (cu dimensiuni prea mici) dar ei ar putea fi puşi în evidenţă prin CT sau RMN. Într-un anumit sens, penetranţa poate fi considerată „un artefact" determinat de abilitatea noastră de a *recunoaşte* (clinic şi/sau paraclinic) expresia sau fenotipul genei mutante.
- *Vârsta de debut* a primelor manifestări clinice este variabilă în multe boli AD (vezi mai jos); Vom menţiona aici că în *boala Huntington* penetranţa genei mutante este zero la naştere, 25% la 30 de ani, 50% la la 40 de ani şi 100% la 70 de ani.
- *Sexul persoanei* poate unori influenţa manifestarea genei mutante; de exemplu, în *cancerul de sân familial produs prin mutaţia genei BRCA2*, penetranţa genei este redusă la bărbaţi al căror ţesut glandular este redus şi nedependent de stimularea hormonală.

Cauzele penetranţei reduse, incomplete, nu sunt clare dar intervin probabil factori genetici şi negenetici, care pot avea – într-o anumită conjunctură – un efect antagonic, „supresor", asupra manifestării unei gene. Un exemplu edificator este *deficienţa în factorul V Leiden,* prezentată în caseta 5.5; vom mai adăuga faptul că în *hipercolesterolemia familială* depozitele de colesterol din pereţii vaselor sanguine, ce determină simptomatologia principală a bolii, pot fi reduse de o dietă sau o medicaţie adecvată (statine); vom aminti de asemenea „bolile induse de medicamente" (farmacogenetica) – ca *porfiria acută intermitentă* sau *hipertermia malignă* – care vor fi „declanşate" numai în anumite condiţii de mediu (vezi capitolul 8.A.3).

CASETA 5.5 *OMI 227400.*

DEFICIENŢA ÎN FACTORUL V LEIDEN

Un exemplu interesant şi util de ştiut îl furnizează deficienţa în factorul V Leiden, transmisă AD (gena este localizată pe cromosomul 1q23). Factorul V este o componentă a cascadei de coagulare a sângelui. Mutaţia Leiden (numită astfel după oraşul din Olanda în care a fost descoperită) produce o alterare a funcţiei factorului V. Heterozigoţii pentru alela factorului V Leiden prezintă o stare de hipercoagulabilitate, care determină un risc crescut de producerea unor tromboze venoase profunde (TVP) la membrele inferioare[37], de unde cheagurile se pot desprinde şi ajunge, prin circulaţie, în plămâni producând o embolie pulmonară (EP). Fenotipul clinic TVP se manifestă numai la circa 50% din heterozigoţi, deci nu orice persoană care moşteneşte gena mutantă va dezvolta boala deoarece trebuie să intervină alţi factori de risc pentru TVP şi EP: folosirea de contraceptive orale (!), sedentarismul, sarcina, prezenţa unui cateter venos central, alţi factori de mediu sau genetici ce contribuie la hipercoagulabilitatea sângelui; toate acestea explică penetranţa redusă a genei.

(2). **Mutaţii germinale noi.** Pacienţii afectaţi pot fi primul şi singurul caz de boală AD din familie; în această situaţie se presupune că apariţia bolnavului din părinţi sănătoşi şi homozigoţi (*n/n*) (figura 5.24.c) este consecinţa unei *mutaţii spontane noi (neomutaţii)* apărută în timpul gametogenezei, de obicei la bărbat; această ipoteză se va lua în consideraţie după ce s-au eliminat celelalte posibilităţi: penetranţa redusă, expresivitatea variabilă şi non-paternitatea.

De altfel, mutaţiile noi sunt frecvente în numeroase boli AD care, datorită gravităţii handicapului clinic sau reducerii până la anulare a capacităţii reproductive, nu pot fi transmise de la părinţi la descendenţi. În *osteogenesis imperfecta tipul II (OMIM 166200)*, boală AD – caracterizată prin fragilitate osoasă – letală perinatal, toate cazurile reprezintă mutaţii noi. Un alt exemplu frecvent citat este al *acondroplaziei (OMIM 100800)* – un nanism disproporţionat pe seama membrelor, foarte scurte – în care se apreciază că 80% din cazuri sunt produse prin neomutaţii. În *neurofibromatoză* acestea reprezintă 50% din cazuri.

(3). **Mozaicismul germinal.** Mult mai rar, mutaţiile se pot produce precoce în viaţa embrionară, afectând unii din precursorii gameţilor; se formează astfel o sub-populaţie de gonocite ce poartă mutaţia, deci un *mozaicism germinal* care poate explica apariţia *mai multor copii afectaţi* din părinţi sănătoşi (figura 5.24.d). Considerat foarte rar, acest mecanism începe să fie probat prin analizele moleculare: de exemplu, a fost demonstrat în 6% din cazurile de copii cu *osteogenesis imperfecta* născuţi din părinţi sănătoşi, precum şi în alte boli (neurofibromatoză sau unele boli recesive-legate de X).

c). Expresivitatea variabilă.

Expresivitatea, spre deosebire de penetranţă, este o noţiune calitativă, care defineşte gradul, intensitatea, natura, severitatea manifestării fenotipice a unei gene mutante şi penetrante la bolnavi diferiţi. Atunci când aceşti parametri sunt diferiţi pentru expresia unei gene mutante se foloseşte termenul de **expresivitate variabilă** (figura 5.24.b)**.**

Expresivitatea variabilă interesează:

[37] Circa 40% din indivizii care fac TVP sunt heterozigoţi pentru alela factorului V Leiden

- spectrul de manifestarea a simptomelor şi distribuţia lor,
- vârsta de debut a semnelor,
- intensitatea (severitatea) exprimării,
- limitarea manifestării la pacienţii de un anumit sex.

(1). Spectrul de manifestare al simptomelor şi distribuţia lor. Numeroase boli AD, mai ales cele cu pleiotropie (manifestări variate în organe multiple) prezintă o expresivitate variabilă. În capitolul 4.A.4.2 exemplificam acest concept la bolnavii cu sindrom Marfan (caseta 4.1), la care pot să nu apară toate anomaliile celor trei sisteme afectate (schelet, ochi, aparat cardiovascular) sau la care severitatea clinică este diferită; prezentăm acum un arbore genealogic ilustrativ (figura 5.25), în care toţi indivizii vii afectaţi au *aceiaşi mutaţie* în gena fibrilinei dar prezintă o variabilitate marcată în vârsta de debut, distribuţia şi severitatea semnelor. Un alt exemplu ilustrativ este cel al neurofibromatozei (*NF1*) sau boala Von Recklinghausen (vezi capitolul 11.E.1) care prezintă manifestări cutanate (multiple pete *café au lait*, pistrui axilari, ş.a), oftalmologice (noduli Lisch în iris, ş.a), musculoscheletice (scolioză, statură mică ş.a.), neuropsihiatrice (dificultăţi de învăţare sau retard mintal, convulsii etc) şi tumorale (neurofibroame de diverse mărimi, glioame de căi optice sau SNC, feocromocitoame ş.a). Toate aceste modificări se dezvoltă la vârste diferite (primele semne ce apar la copii sunt petele multiple *café au lait*) şi au o mare variabilitate a distribuţiei severităţii.

Modul şi gradul (severitatea) de manifestare a unei boli AD determinată de o anumită genă mutantă *nu poate fi prezis,* nici chiar la bolnavii din aceeaşi familie, care au aceeaşi mutaţie genică. În schimb, cunoaşterea întregului *spectru de manifestare* al unei boli monogenice AD permite evaluarea şi diagnosticul complet al unui pacient, precum şi cercetarea unor cazuri oligo- sau mono-simptomatice, puţin evidente, în familie. Toate acestea vor influenţa calitatea diagnosticului, conduita medicală, prevenţia unor complicaţii şi acurateţea sfatului genetic.

(2). Vârsta de debut a semnelor. O problemă corelată cu expresivitatea variabilă este vârsta de debut a manifestărilor unor boli AD pleiotrope. Diversele semne apar în timp, la vârste diferite (penetranţă dependentă de vârstă); uneori primele manifestări ale unor boli (ca *ADPKD, hipercolesterolemia familială, polipoza de colon, boala Huntington* ş.a) apar tardiv la adult. În figura 5.26 prezentăm exemplul clasic al *coreei Huntington* – o boală degenerativă neurologică caracterizată prin mişcări anormale (coree) şi pierderea progresivă a funcţiilor mintale (demenţă) – în care primele semne apar, în medie la 35 de ani. Persoana care a moştenit gena mutantă este mult timp asimptomatică, fără să ştie că posedă mutaţia în momentul în care îşi alcătuieşte o familie şi decide să aibe copii (cărora, evident, le poate transmite gena anormală). Acest lucru scoate în evidenţă utilitatea anamnezei familiale şi importanţa unor teste de diagnostic presimptomatic (vezi capitolul 18).

În acest context, vom menţiona şi fenomenul de **anticipaţie**: în unele afecţiuni AD semnele de boală se manifestă în generaţii succesive la o vârstă tot mai precoce şi cu o severitate tot mai mare. Mult timp existenţa anticipaţiei a fost discutabilă dar astăzi se ştie că este un fenomen cert, mai ales în *bolile prin amplificarea repetiţiilor trinucleotidice* (vezi capitolele 6.B.1.4 şi 11.C), în care numărul acestor expansiuni instabile va creşte în succesiunea generaţiilor determinând o vârstă de debut tot mai precoce şi o severitate mai mare.

(3). Limitarea manifestării la pacienţii de un anumit sex. Expresivitatea variabilă a unor boli poate să se manifeste şi prin afectarea predominantă (sau chiar limitată) a unui anumit sex. Ne referem mai sus la *cancerul de sân familial produs prin mutaţia genei BRCA2* csre este foarte rar la bărbaţi, dar sunt şi alte exemple de boli AD manifeste la un anumit sex; vom mai cita: *porfiria acută intermitentă* predominantă la sexul feminin sau *pubertatea precoce familială limitată* la sexul masculin.

> În acest ultim exemplu, pubertatea apare precoce la 4-5 ani, datorită unei mutaţii a receptorului pentru hormonul luteinizant care, aşa cum se observă în figura 5.27, se transmite AD (vezi transmiterea tată → fiu) dar gena este nemanifestă la persoanele de sex feminin (I-1, II-1,II-5) care o moştenesc şi o transmit la descendenţi.

Cauzele expresivităţii variabile sunt greu de definit. Sigur, la bolanvii cu aceiaşi afecţiune dar din familii diferite, prima explicaţie a expresivităţii variabile poate fi *heterogenitatea alelică*, deci existenţa unor mutaţii diferite. De exemplu, în *osteogenesis imperfecta* mutaţiile care afectează aminoacizii dinspre capătul carboxil al moleculei de procolagen vor da forme mai grave de boală decât cele care afectează aminoacizii dinspre capătul amino terminal.

Pentru bolnavii din aceeaşi familie sau din familii diferite care au aceeaşi mutaţie cauzele fenomenului sunt, însă, altele. Se invocă interacţiunea genei-boală cu alte *gene modificatoare* (caseta 5.6) şi/sau cu unii *factori de mediu*; o dovadă indirectă a existenţei genelor modificatoare o reprezintă expresia mai frecventă/predomi nantă sau exclusivă/limitată a unor gene autosomale la un anumit sex.

2.3 TRANSMITEREA AUTOSOMAL RECESIVĂ

Circa 1/3 din caracterele monogenice sunt transmise autosomal recesiv (AR). Cele mai frecvente boli AR în populaţia europaeană sunt hemocromatoza şi fibroza chistică sau mucoviscidoza. Alte afecţiuni AR: surditatea congenitală (unele forme), fenilcetonuria, atrofia musculară spinală, cecitatea recesivă, sindromul adrenogenital, sicklemia, talasemia, albinismul oculo-cutanat, etc. Marea majoritate a erorilor înăscute de metabolism se trasnmit de asemnea AR:

CASETA 5.6.

Genele modificatoare

Multe boli mendeliene prezintă diferenţe în ceea ce priveşte vârsta de apariţie, severitatea bolii şi alte caracteristici fenotipice. De fapt, expresia unitară/identică a unor asemenea boli pare sa fie excepţia şi nu regula (o asemenea exceptie pare sa fie de exemplu albinismul, boală genetică determinată de deficienţa completă a tirozinazei). Printre factorii care determină această diversitate fenotipică sunt implicate variantele alelice, mediul şi genele modificatoare. Exemplele privind variantele alelice şi factorii de mediu sunt relativ numeroase şi bine caracterizate. Existenţa unor gene modificatoare a fost iniţial postulată o data cu descrierea unor diferenţe fenotipice la purtătorii aceleiaşi variante alelice şi în absenţa intervenţiei unor factori de mediu. Asemenea gene modificatoare pot afecta penetranţa, expresivitatea şi pleiotropia sau pot modifica dominanţa unor mutaţii. In funcţie de natura efectului lor, genele modificatoare pot determina fenotipuri mai severe, mai puţin severe sau chiar fenotipuri noi. Epistazia, care apare atunci când o alelă a unei gene maschează fenotipul unei alte gene, este o formă de modificare genetică. Deşi sunt probabil extrem de numeroase, numărul genelor modificatoare bine documentate la om este în prezent relativ redus.

- *Gene modificatoare ale penetranţei*. Deşi penetranţa incompletă este o trăsătură comună a unor numeroase boli mendeliene, există puţine exemple pentru care să se ştie că variabilitatea pentranţei se datorează unor gene independente. Un exemplu a fost descris în cazul surdităţii non-sindromice determinată de mutaţii ale genei DFNB26 de pe cromosomul 4q31. Au fost descrise cazuri în care indivizi homozigoţi pentru mutaţia prezentă în familie au totuşi auz normal. La aceşti indivizi a fost cartografiată o gena modificatoare dominantă localizată pe cromosomul 7 care reduce penetranţa mutaţiei cauzatoare de boală. De asemeni, pe cromosomul 8, în apropierea markerului D8S277, a fost localizată o genă care modifică penetranta mutaţiei 1555A>G de la nivelul genei mitocondriale pentru ARNr 12S, ce produce surditatea transmisă matriliniar.
- *Gene modificatoare ale dominanţei*. Una dintre mutaţiile implicate în producerea retinitei pigmemtare cu transmitere autosomal recesivă este cea a genei pentru periferina-1 (PRP1). Au fost însă descrise cazuri în care mutaţii heterozigote ale acestei gene se însoţesc de prezenţa bolii, deşi se aşteapta ca numai indivizii homozigoţi să fie bolnavi. Aceste cazuri au fost explicate prin asocierea unor variante alelice la nivelul genei neînlanţuite ROM1 (care codifică proteina 1 a porţiunii externe a celulelor cu bastonaş de la nivelul retinei). Ca urmare, o alelă care are în mod normal un efect recesiv în producerea retinitei pigmentare poate sa acţioneze ca o alelă dominantă atunci când se asociază o alela particulară a genei neînlanţuite ROM1.
- *Expresivitatea variabilă*. Un exemplu de genă modificatoare implicată în producerea expresivităţii variabile este cel al hipercolesterolemiei familiale, boală transmisă autosomal dominant care afectează una din 500 de persoane din populatia generală şi determină o creştere semnificativă a riscului pentru bolile cardiovasculare ca urmare a creşterii colesterolemiei. S-a constatat că unii purtători heterozigoţi pentru mutaţia cauzatoare de boală au un nivel al colesterolemiei care este cu 25% mai mic decât cel aşteptat. La asemenea indivizi a fost cartografiată o genă modificatoare localizată pe cromosomul 13q.

- *Pleiotropia*. Febra mediteraneeana familială (FMF) este o boală autosomal recesivă comună în regiunea mediteraneeană caracterizată prin febră recurentă şi inflamaţia seroaselor. Boala este determinată de mutaţii ale genei pentru pirina/marenostrina. O complicaţie variabilă a acestei boli este asocierea amiloidozei renale ce conduce la insuficienţă renală. Unele studii au aratat ca asocierea variabilă a acestei complicaţii este explicată, cel puţin în parte, de unele variante polimorfice la nivelul genei pentru amiloidul A seric. De asemeni, o genă modificatoare a apariţiei ileusului meconial în cadrul fibrozei chistice a fost localizată la nivelul cromosomului 19q13.

Deşi pe de o parte fenomene precum dominanţa incompletă, expresivitatea variabilă sau pleiotropia complică analiza genetică a caracterelor mendeliene, identificarea genelor modificatoare responsabile de asemenea fenomene se poate dovedi sursa unor noi metode de diagnostic, tratament şi prevenţie a bolilor genetice.

a). Caracteristici şi criterii de transmitere AR

O genă recesivă îşi exercită efectul *numai în stare homozigotă (a/a)*, întrucât în stare heterozigotă (*N/a*) boala nu apare deoarece efectul alelei normale (*N*) este suficient pentru realizarea funcţiei, cu toate că alela mutantă (*a*) produce o reducere a funcţiei controlată de locusul respectiv. Pentru a se realiza starea homozigotă individul bolnav primeşte o genă mutantă de la fiecare din părinţii săi. Astfel, în cazul afecţiunilor recesive, spre deosebire de cele dominante, *moştenirea se face prin ambii părinţi* care, în cea mai mare parte a cazurilor, sunt sănătoşi şi **purtători** de genă mutantă, deci heterozigoţi: *N/a + N/a*. După cum se observă din tabelul 5.7 (poziţia 1) în descendenţa lor rezultă teoretic un raport fenotipic de 3 sănătoşi la 1 bolnav; acest raport se verifică însă numai în cazul unor afecţiuni mai frecvente, puţin severe, şi în familiile mari sau cumulând datele obţinute de la mai multe familii[38].

Tabel 5.7. Transmiterea recesivă autosomală a unui caracter patologic.

Sănătoşi (*N/N* ; *N/a*) şi bolnavi (*a/a*)

Combinaţii genotipice parentale	Gameţi	Descendenţi	
		Genotipuri	Fenotipuri
1. *N/a* x *N/a*	(*N* + *a*) x (*N* + *a*)	¼ *N/N* ; ½ *N/a* ¼ *a/a*	¾ sănătoşi din care 2/3 purtători ¼ bolnavi, indiferent de sex.
2. *N/a* x *N/N*	(*N* + *a*) x (*N*)	½ *N/N* ; ½ *N/a*	Toţi sănătoşi, ½ purtători
3. *a/a* x *N/N*	(*a*) x (*N*)	*N/a*	Toţi sănătoşi şi purtători
4. *a/a* x *N/a*	(*a*) x (*N* + *a*)	½ *N/a*; ½ a/*a* ;	½ sănătoşi şi purtători, ½ bolnavi
5. *a/a* x *a/a*	(*a*) x (*a*)	*a/a*	Toţi bolnavi

Din datele prezentate mai sus se poate formula o regulă importantă a transmiterii autosomal recesive (AR): *doi părinţi sănătoşi, heterozigoţi pentru aceeaşi pereche de gene alele, pot avea copii (fete şi băieţi) bolnavi cu o anomalie AR*. De subliniat faptul că ambele sexe sunt afectate în proporţii cvasi-egale şi pot transmite alela mutantă cu aceiaşi probabilitate (elemente logice pentru localizarea autosomală a genei).

Deoarece părinţii bolnavului sunt sănătoşi, în arborele genealogic (figura 5.28) se înregistrează *o discontinuitate a bolii în succesiunea generaţiilor.* Bolnavul poate fi singurul membru afectat al familiei[39]; dacă apar şi alte cazuri, ele se găsesc frecvent în aceeaşi fratrie, dând aspectul unei transmiteri *orizontale*.

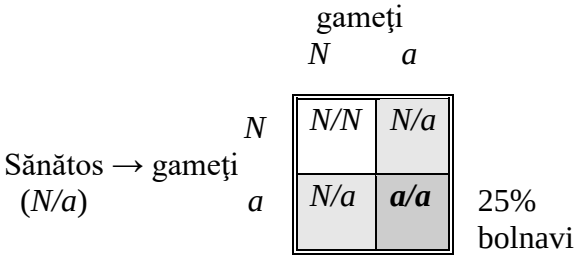
Riscul unui cuplu de indivizi normali şi heterozigoţi de a avea un copil bolnav (*a/a*) este de 25% sau ¼ la fiecare sarcină, ca eveniment independent. Ar fi greşit să credem că în familiile cu patru copii este obligatoriu ca

Sănătos (*N/a*)

↓

[38] După adunarea datelor se impune o prelucrare şi o corecţie statistică pentru a compensa pierderea de informaţii determinată de fratriile ce provin din căsătorii între heterozigoţi şi care nu au nici un bolnav; altfel, proporţia de homozigoţi afectaţi va fi mai mare de 25%.

[39] Se realizează aspectul unui caz izolat/sporadic dar ar fi o greşeală să considerăm că boala nu este ereditară numai pentru că nu sunt alte cazuri în familie.



numai unul să fie afectat, sau mai rău, dacă s-au născut trei copii sănătoşi al patrulea va fi bolnav. Riscul de ¼ este valabil la fiecare sarcină; să ne imaginăm o loterie cu patru bile, trei albe şi una neagră, din care la fiecare naştere s-ar extrage o bilă; înaintea naşterii următoare „bila se pune la loc" şi tragerea se repetă. Uneori pot exista familii cu şansa de a avea 1-4 copii normali, alteori se pot naşte succesiv doi bolnavi.

În afara combinaţiei a doi heterozigoţi, alte încrucişări din care pot rezulta copii bolnavi sunt trecute în tabelul 5.7, în poziţiile 4 şi 5. Ocazional, un bolnav (*a/a*) se poate încrucişa cu un sănătos heterozigot (*N/a*) şi atunci 50% din descendenţi ar putea fi afectaţi; pe arborele genealogic se înregistrează un apect de **pseudo-dominanţă**, boala fiind prezentă în două generaţii (figura 5.29). În sfârşit, mult mai rar, din *încrucişarea dintre doi bolnavi, homozigoţi pentru aceeaşi mutaţie* (*a/a x a/a*) *vor rezulta numai descendenţi bolnavi* (*a/a*). Acest tip de uniune „asortativă" se observă în colectivităţi speciale (deficienţi vizuali, surzi ş.a) şi pentru boli ce nu afectează capacitatea reproductivă. De la regula enunţată mai sus fac excepţie situaţiile de heterogenitate genetică în care bolnavii cu afecţiuni asemănătoare clinic au mutaţii în gene (loci) diferite (figura 5.30); întrucât părinţii bolnavi nu sunt homozigoţi pentru aceeaşi mutaţie descendenţii lor vor fi dublu heterozigoţi şi sănătoşi.

În afecţiunile autosomal recesive se observă că printre părinţii bolnavului există o mare proporţie mai mare de căsătorii între persoane care au cel puţin un strămoş comun (consanguinitate), în special între veri primari.

În concluzie, criteriile majore pentru diagnosticul eredităţii recesive autosomale la om sunt următoarele:

- marea majoritate a persoanelor afectate sunt urmaşi ai părinţilor aparent sănătoşi dar heterozigoţi; riscul lor de a avea un copil bolnav este 1/4, indiferent de sex;
- dacă bolnavii se căsătoresc cu persoane normale şi homozigote toţi copiii vor fi sănătoşi; se înregistrează astfel aspectul de discontinuitate a bolii în succesiunea generaţiilor sau de cazuri izolate;
- dacă un bolnav se căsătoreşte cu o persoană sănătoasă şi heterozigotă, riscul de a avea descendenţi bolnavi, fete şi băieţi, este de 50% (pseudo-dominanţă); în acest caz, transmiterea mamă-fiică este posibilă.
- doi părinţi bolnavi (homozigoţi pentru aceleaşi gene) nu vor avea copii sănătoşi.
- părinţii copilului afectat sunt mai frecvent rude, comparativ cu părinţii copiilor sănătoşi (deci frecvenţa crescută a consanguinităţii).

În afara criteriilor enunţate mai sus, bolile AR se caracterizează prin faptul că sunt, în general, anomalii prin lipsă (hipoplazie, hipofuncţie, deficit enzimatic etc), deseori mai grave decât cele AD.

b). Consanguinitatea în anomaliile recesive.

Probabilitatea ca două persoane să fie purtătoare (*N/a*) ale aceleiaşi mutaţii creşte dacă persoanele respective sunt înrudite pentru că fiecare poate moşteni gena mutantă de la un strămoş comun; această situaţie este numită **consanguinitate** şi se notează în arborele genealogic printr-o linie dublă.

S-a observat că frecvenţa consnguinităţii parentale în bolile AR este invers proporţională cu frecvenţa genei recesive: *cu cât boala este mai rară, cu atât consanguinitatea la părinţi este mai frecventă*. Astfel în cazul unei afecţiuni cu o frecvenţă de 1:10.000 (albinismul) circa 6% dintre părinţii copiilor bolnavi vor fi veri primari, faţă de 1% cât există în populaţia generală europeană. Procentul va creşte la 16% dacă afecţiunea este de 10 ori mai rară (1:100.000).

Părinţii înrudiţi posedă un procentaj mai mare de gene identice, comparativ cu populaţia generală. Acest procent depinde de gradul de înrudire, fiind de 1/8 la verii primari, 1/32 la verii de gradul II ş.a.m.d (tabelul 5.8)

Tabelul 5.8 Coeficientul de înrudire (r) şi consanguinitate (F) în diferite tipuri de încrucişări între rude.

Tip de încrucişare	Coeficient de înrudire (r)	Coeficient de consanguinitate (F)
Tată –fiică; frate – soră; gemeni dizigoţi	1/2	1/4
Unchi – nepoată; demi-frate – demi-soră	1/4	1/8
Veri de gradul I; demi-unchi – demi-nepoată	1/8	1/16
Văr de gradul I – vară de gradul II; demi-veri primari	1/16	1/32
Veri de gradul II	1/32	1/64
Văr gradul II – vară gradul III	1/64	1/128
Veri de gradul III	1/128	1/256

Coeficientul de înrudire (r) este proporţia de gene comune (identice) din totalul genelor persoanelor ce au un strămoş comun. Coeficientul de consanguinitate (F) este probabilitatea ca un urmaş să fie homozigot pentru gene ce provin de la părinţi, cu un anumit grad de rudenie, de la un strămoş comun. F = r/2. Cei doi coeficienţi se calculează prin metode speciale.

Deoarece părinţii înrudiţi au un număr mai mare de gene (normale sau anormale) în comun, *consanguinitatea creşte riscul de întâlnire a heterozigoţilor* şi favorizează apariţia subiecţilor homozigoţi afectaţi. Astfel, dacă într-o populaţie frecvenţa heterozigoţilor pentru o afecţiune recesivă este 1/50, probabilitatea unei persoane de a avea un copil bolnav căsătorindu-se cu o persoană neînrudită este 1/50 x 1/50 x 1/4 = 1/10.000; dacă s-ar căsători cu vara sa primară atunci riscul naşterii unui copil afectat este 1/50 x 1/8 x 1/4 = 1/1.600, deci de circa şase ori mai mare.

Se apreciază că *riscul global* al unui descendent anormal din căsătoria între veri primari este totuşi mic (3-5%), aproape dublu faţă de cel al populaţiei generale (2-3%). Consecinţele unui incest (încrucişarea dintre rude de gradul I) sunt însă mult mai dezastruoase: ½ - ¼ din descendenţi vor fi anormali (retardul mintal fiind pe locul întâi).

c). Heterozigoţii în anomaliile recesive.

Unul dintre cele mai importante aspecte legate de transmiterea AR îl constituie studiul şi depistarea heterozigoţilor (*N/a*). Ei sunt fenotipic sănătoşi şi atunci când se căsătoresc cu un alt heterozigot sănătos au un risc de 25% de a avea un copil bolnav. Problema devine „acută" în familiile în care există un individ afectat de o boală recesivă. Probabilitatea ca o persoană să moştenească în acest caz gena autosomală depinde de gradul înrudirii cu bolnavul (figura 5.31): cu cât este mai apropiat, cu atât riscul este mai mare. Astfel fratele/sora unui bolnav cu o afecţiune recesivă are o probabilitate de 2/3 de a fi heterozigot; aceasta se reduce la 1/3 pentru copilul lor sănătos (nepot al bolnavului)

Întrucât genele recesive se transmit *nemanifeste* din generaţie în generaţie, până ce se realizează starea homozigotă (ca şi râurile subterane care atunci când afluează ţâşnesc la suprafaţă), există riscul ca oricine să posede astfel de gene şi deci să fie heterozigot. Acest risc se poate estima pe baza frecvenţei afecţiunii în populaţie (vezi capitolul 7) şi se poate calcula aproximativ după formula:

$h = 2\sqrt{\text{frecvenţa boli}}$;

deci frecvenţa heterozigoţilor este de două ori rădăcina pătrată a frecvenţei afecţiunii în populaţie. De exemplu, dacă fenilcetonuria are o frecvenţă de 1:10.000, frecvenţa heterozigoţilor este de 1/50. Prevalenţa heterozigoţilor pentru unele afecţiuni AR mai frecvente este de 1/10 pentru *hemocromatoză* (1:400); 1/25 pentru *fibroza chistică* sau *mucoviscidoză* (1:2.500); 1/30 pentru *surdimutitate* (1:3.600); 1/35 pentru *sindromul adreno-genital* (1:5.000). Se observă că *în populaţie numărul heterozigoţilor este foarte mare comparativ cu cel al bolnavilor homozigoţi recesivi*. În aceste condiţii posibilitatea întâlnirii a doi heterozigoţi este mare; astfel, se estimează că în Europa de Vest 1:625 cupluri este alcătuit din heterozigoţi pentru fibroza chistică. Genele recesive morbide sunt deci relativ comune şi, pentru că sunt multe afecţiuni recesive este probabil că fiecare dintre noi să purtăm câteva gene anormale în stare heterozigotă.

În anumite populaţii frecvenţa bolilor recesive şi deci cu atât mai mult a heterozigoţilor este foarte mare: *sicklemia* în Africa, *beta-talasemia* în Italia şi Grecia, *hemocromatoza* şi *fibroza*

chistică/mucoviscidoza în Europa de Vest şi Nord, *nefroza congenitală* în Finlanda, *boala Tay-Sachs* la evreii Ashkenazi (originari din centrul şi estul Europei). Explicaţiile acestui fenomen (avantajul selectiv al heterozigoţilor, efectul de fondator, izolarea etnică sau religioasă etc) vor fi discutate în capitolul 7.

Aşa cum am mai spus, noţiunile de dominant şi recesiv sunt valabile pentru fenotip, pentru caracter, şi reprezintă o simplificare a relaţiilor moleculare, deoarece ambele alele ale genelor se manifestă întotdeauna la nivel molecular. Acest lucru permite *depistarea heterozigoţilor*, sănătoşi dar purtători, pentru acele afecţiuni la care se cunoaşte efectul primar al genei şi la care acesta poate fi evidenţiat. Ne vom referi pe larg la acest aspect important al profilaxiei bolilor genetice (în capitolul 18.4) dar acum vom reaminti exemplul sicklemiei (capitolul 4.B.1) în care heterozigoţii sunt identificaţi, simplu, prin electroforeza hemoglobinei, care evidenţiază HbA şi HbS.

d). Heterozigoţii compuşi.

Heterogenitatea alelică este un fenomen frecvent în bolile AR: o genă poate suferi mutaţii alelice diferite. De exemplu, în beta-talasemie s-au identificat numeroase mutaţii în gena *HBB*; deseori la bolnavi cele două alele ale locilor *HBB* sunt anormale (*a/a*) dar au mutaţii diferite (*a1/a2*) şi aceştia sunt de fapt *heterozigoţi compuşi (a1/a2).* Se pare că în cele mai multe din bolile recesive indivizii afectaţi sunt în fapt mai curând heterozigoţi compuşi decât homozigoţi adevăraţi, exceptând evident situaţiile în care părinţii lor sunt înrudiţi şi au moştenit *aceeaşi mutaţie* de la un strămoş comun sau când în acea populaţie predomină o anumită mutaţie, ca urmare a efectului de fondator.

e). Variabilitatea în bolile recesive.

Bolile recesive prezintă deseori o penetranţă completă şi o variabilitate clinică redusă. Există însă şi excepţii: în hemocromatoza (vezi caseta 3.1) de pildă nu toţi bolnavii (*a/a*) dezvoltă boala iar femeile sunt relativ protejate datorită pierderilr de fier din cursul menstruaţiei. De asemenea în *mucoviscidoză* bolnavii pot avea o mare variabilitate a distribuţiei şi severităţii manifestărilor digestive, pulmonare etc (vezi capitolul 11.E.2), explicabilă prin mutaţii diferite, specifice, ale genei *CFTR*; homozigoţii care au mutaţia F508del prezintă insuficienţă pancreatică dar în alte mutaţii funcţia pancreatică este cvasi-normală, fenomenele pulmonare reduse sau se observă o absenţă congenitală a canalelor deferente.

Mutaţiile noi sunt rare în bolile AR şi, de regulă, se poate presupune că ambii părinţi ai unui copil afectat sunt heterozigoţi. Totuşi 1% din cazurile de *atrofie musculară spinală* (SMA) tip I (boala Werdnig-Hoffman) copilul afectat moşteneşte o alelă de la unul din părinţi care este heterozigot iar cealaltă alelă provine printr-o mutaţie germinală nouă de la un părinte ne-purtător; în aceste cazuri riscul de recurenţă este foarte mic.

Aşa cum am precizat mai sus heterogenitatea alelică este frecventă în bolile AR; dar şi heterogenitatea de locus se întâlneşte in unele afecţiuni AR. Multe din surdităţile congenitale sau formele de cecitate recesivă sunt produse de mutaţii în loci autosomali diferiţi.

Vom menţiona, în sfârşit, fenomenul de disomie uniparentală prin care un copil afectat poate moşteni ambele copii ale unui cromosom (cu alela mutantă) de la unul din părinţi, dar asupra acestui fenomen, rar dar interesant, vom reveni mai târziu.

2.4 TRANSMITEREA LEGATĂ DE SEX

Transmiterea legată de sex se referă la ereditatea genelor situate pe cromosomii sexuali. După cum ştim deja, cromosomii X şi Y au morfologie, gene, roluri şi distribuţie diferită la cele două sexe. Prima diferenţă majoră este reprezentată de dimensiunea şi numărul redus de gene al cromososomului Y (aproape 2/3 din Yq este reprezentat de ADN înalt repetitiv, inactiv genetic). Marea majoritate a genelor sunt implicate în determinismul sau controlul unor caractere sexuale, specific masculine, şi nu au alele omologe pe X. Numai o mică parte din genele cromosomului Y, situate mai ales în regiunile pseudo-autosomale, au alele omologe[40] pe X şi pot realiza recombinări în cursul meiozei. Cromosomul X (cu peste 1100 de gene) are gene de sexualizare dar şi gene

[40] Genele omologe de pe X şi Y pledează pentru originea filogenetică a cromosomilor sexuali dintr-o pereche de autosomi omologi.

nesexuale. O a doua diferenţă majoră este reprezentată de faptul că genele de pe X se vor găsi la organismele feminine (XX) în doză dublă (homozigote sau heterozigote) în timp ce la bărbaţi (XY) vor fi în doză unică (hemizigot). Această diferenţă de dozaj este compensată (aproape complet) prin inactivarea unuia din cei doi cromosomi X de la femeie.

Ţinând cont de datele precizate sintetic mai sus – este logic să presupunem că există mai multe modele particulare de transmitere legată de sex:

- transmiterea caracterelor legate de Y;
- transmiterea caracterelor determinate de genele regiunilor pseudo-autosomale;
- transmiterea cararacterelor legate de X, recesivă sau dominantă.

a). Transmiterea legată de Y (holandrică)

Un caracter legat de Y se transmite de la tată, prin cromosomulY, la toţi fii săi. Se cunosc extrem de puţine caractere patologice cu acest mod de transmitere (de exemplu, o formă de *retinită pigmentară* care se transmite de la tată exclusiv la băieţi; OMIM 400004). Mutaţiile genelor implicate în determinismul şi diferenţierea sexuală (dintre care cel mai bine cunoscute sunt mutaţiile genei *SRY*) produc o inversiune sexuală şi/sau sterilitate. În schimb alelele polimorfice ale ADN din cromosomul Y se transmit după modul *holandric* precizat mai sus.

b). Transmiterea caracterelor determinate de gene din regiunile pseudo-autosomale X şi Y.

Pentru a recunoaşte un caracter determinat de o genă din această regiune, trebuie studiată ascendenţa şi descendenţa subiecţilor de sex masculin. Cei care au moştenit caracterul de la tatăl lor, prin intermediul cromosomului Y, îl vor transmite mai frecvent la fii lor, în timp ce cei care l-au primit de la mama lor; prin intermediul cromosomului X, îl vor transmite preferenţial fetelor lor. Acest mod de ereditate a fost numită *ereditate parţial legată de sex*.

Până în prezent se cunoaşte un singur exemplu: *discondrosteoza Leri-Weil,* o displazie scheletică cu statură mică disproporţionată şi deformarea antebraţului, produsă de mutaţia genei *SHOX*, genă pseudoautosomală care nu este inactivată, ce codifică un factor de transcripţie implicat în reglarea creşterii. În arborele genealogic (figura 5.32) frecvenţa crescută a bolii la femei sugerează o transmitere dominantă legată de X dar prezenţa unei transmiteri tată (II3) → fiu (III-5) exclude o ereditate legată strict de X.

c).Transmiterea legată de X

Pe cromosomul X au fost localizate peste 1100 de gene din care circa 50% se asociază cu fenotipuri anormale. Ele au o distribuţie diferită la cele două sexe şi un mod de transmitere particular, uşor de identificat. Luând în discuţie o genă mutantă situată pe X sunt posibile cinci genotipuri: X^NY şi X^aY - la bărbat, X^NX^N, X^NX^a şi X^aX^a – la femeie. Mutaţia genei se exprimă la bărbat (hemizigot) indiferent dacă manifestarea ei fenotipică este dominantă sau recesivă. La femeile heterozigote X^NX^a, datorită fenomenului de inactivare întâmplătoare a cromosomului X, alela mutantă se exprimă în 50% din celule indiferent dacă mutaţia produce un fenotip recesiv (cel mai frecvent) sau dominant (rar); deci distincţia fenotipică între transmiterea dominantă şi recesivă se estompează (prin *„hemizigoţie funcţională*) şi este arbitrară, condiţionată de proporţia femeilor heterozigote care manifestă boala şi severitatea ei. În plus, unele mutaţii legate de X se pot asocia cu inactivarea preferenţială a cromosomului X^a la femei, fenomen care poate atenua consecinţele fenotipice. De aceea mulţi geneticieni nu mai clasifică bolile legate de X în recesive legate de X (RLX) şi dominante legate de X (DLX). Considerăm însă că această împărţire este utilă deoarece fenotipurile dominante se exprimă constant la heterozigote în timp ce, în mod obişnuit, fenotipurile recesive nu se manifestă.

2.5. TRANSMITEREA RECESIVĂ LEGATĂ DE X

Dintre bolile RLX cele mai cunoscute sunt hemofilia, distrofia musculară Duchenne, cecitatea pentru culori, deficienţa în G6PD ş.a.

O mutaţie RLX se manifestă fenotipic la bărbaţii hemizigoţi X^aY (frecvent) şi la femeile homozigote X^aX^a (foarte rar); femeile sănătoase pot fi X^NX^N *sau* X^NX^a (purtătoare de genă mutantă sau conductoare). Cu cele cinci genotipuri sunt posibile următoarele combinaţii (tabelul 5.9) dar în funcţie de boală, în practică, se întâlnesc numai o parte dintre acestea:

Tabel 5.9. Transmiterea recesivă legată de X a unui caracter patologic.
Sănătoşi (X^NY, X^NX^N , X^NX^a) şi bolnavi (X^aY, X^aX^a)

Combinaţii genotipice parentale	Gameţi	Descendenţi	
		Genotipuri	Fenotipuri
1. X^NY x X^aX^N	(X^N + Y) x (X^a + X^N)	¼ X^aY ; ¼ X^NY, ¼ $\underline{X^a}\underline{X^N}$;¼ X^NX^N	Un sfert din copii vor fi bolnavi (aceştia sunt ½ băieţi), toate fetele vor fi sănătoase (½ purtătoare)
2. X^aY x X^NX^N	(X^a + Y) x (X^N + X^N)	X^NY ; $\underline{X^a}\underline{X^N}$	Toţi copii vor fi sănătoşi dar toate fetele vor fi purtătoare
3. X^aY x X^aX^N	(X^a + Y) x (X^a + X^N)	¼ X^aY ; ¼ X^NY, ¼ X^aX^a ; ¼ $\underline{X^a}\underline{X^N}$,	½ băieţi sunt bolnavi ½ fete sunt bolnave, ½ fete sunt purtătoare
4. X^NY x X^aX^a	(X^N + Y) x (X^a + X^a)	X^aY ; $\underline{X^a}\underline{X^N}$	Toţi băieţii bolnavi, toate fetele purtătoare
5. X^aY x X^aX^a	(X^a + Y) x (X^a + X^a)	X^aY ; X^aX^a	Toţi copiii (băieţi şi fete) bolnavi
6. X^NY x X^NX^N	(X^N + Y) x (X^N + X^N)	X^NY ; X^NX^N	Toţi copiii sănătoşi

a). Criteriile transmiterii recesive legate de X.În bolile RLX, de obicei, *bolnavi sunt numai bărbaţii*, care au primit gena mutantă de la femei sănătoase dar purtătoare (combinaţia 1, tabel 5.9). Deci, *din părinţi sănătoşi rezultă copii bolnavi* (1/4) , dar aceştia vor fi *numai băieţi* (1/2), care au primit gena anormală de la mamă; fetele vor fi sănătoase (½ purtătoare). În arborele genealogic (figura 5.33) se înregistrează o *transmitere oblică, în diagonală, şi discontinuă*, de la un bărbat bolnav (bunic, străbunic), prin femei sănătoase dar purtătoare, la un băiat bolnav.

Dacă bolnavii au capacitate de reproducere (de exemplu, în hemofilie) şi se căsătoresc cu o femeie sănătoasă şi homozigotă (combinţia 2) *nu pot transmite boala băieţilor* (transmiterea tată → fiu nu este deci posibilă) sau prin băieţi la generaţiile următoare. În schimb toate fetele vor fi obligatoriu heterozigote, purtătoare.

În cazul unor mutaţii frecvente şi puţin severe ale unor gene de pe X, cum ar fi deficienţa în G6PD (în populaţia Afro-Americană 10% din bărbaţi au deficienţă de G6PD iar 18% din femei sunt heterozigote) sau daltonismul (8% din bărbaţi şi 1:150 din femei) este posibil ca bolnavii (X^aY) să se căsătorească cu o femeie heterozigotă (combinaţia 3, tabel 5.9)[41]; în descendenţa acestui cuplu pot apărea băieţi bolnavi (1/2) dar şi fete bolnave (1/2). În arborele genealogic (figura 5.34) se observă transmiterea tată → fiu dar alela mutantă a băieţilor provine...de la mamă. În aceleaşi afecţiuni sunt uneori posibile şi combinaţiile 4 şi 5 din tabelul 5.9. Se observă fapul că o femeie bolnavă va transmite boala la toţi băieţii (situaţie caracteristică transmiterii RLX) iar din doi părinţi bolnavi rezultă numai copii bolnavi (situaţie sugestivă pentru transmiterea recesivă, în general).

În concluzie, criteriile majore pentru transmiterea RLX sunt următoarele:

- bolnavii sunt aproape exclusiv bărbaţi; ei nu transmit niciodată boala;
- femeile heterozigote sunt deobicei neafectate şi pot avea băieţi bolnavi, indiferent de tipul de căsătorie.
- gena mutantă se transmite de la bărbaţi afectaţi → la femei sănătoase şi purtătoare → şi de la acestea la ½ băieţi; deci există o discontinuitate în succesiunea generaţiilor, doi părinţi sănătoşi (mama heterozigotă) putând avea copii bolnavi, dar numai băieţi
- nu este posibilă niciodată transmiterea tată → fiu (deoarece tatăl îi dă fiului cromosomulY). (când se observă o astfel de situaţie va trebui să ne gândim la o boală AD limitată la sexul masculin; de exemplu, scleroza glomerulară focală, din figura 5.35)

b). Mutaţii noi

Multe boli RLX sunt severe şi nu permit supravieţuirea până la vârsta reproducerii. Distrofia musculară Duchenne (DMD) este exemplul cel mai elocvent. Alelele mutante se pierd astfel din populaţie odată cu bolnavul; şi totuşi prevalenţa bolii nu se modifică deoarece alte cazuri apar prin mutaţii noi, din femei sănătoase şi cert nepurtătoare. În DMD circa 1/3 din cazuri apar din cupluri de părinţi sănătoşi, în care femeia nu este heterozigotă; în hemofilie selecţia este doar parţială si numărul de mutaţii noi este mult mai mic.

[41] Combinaţia X^aY + X^aX^N este posibilă, cu o probabilitate de 1:5.000, şi în cazul hemofiliei dar se pare că hemofilia în stare heterozigotă este letală la femei.

c). Femei afectate de boli recesive legate de X

Bolile recesive legate de X se manifestă aproape exclusiv la sexul masculin. Prezenţa certă a unei astfel de boli la o persoană de sex feminin are multiple explicaţii.

- Încrucişarea între un bolnav şi o femeie purtătoare (combinaţia 3, tabel 5.9)(figura 5.33); aşa cum am spus această eventualitate, rară, se întâlneşte mai ales în bolile RLX frecvente în anumite populaţii şi care sunt mai puţin severe.
- Inactivarea „neechilibrată" a cromosomului X la femeile heterozigote X^a/X^N, care face ca o proporţie mai mare de celule să aibă activ X^a.
- Inactivarea „preferenţială" a unui cromosom X anormal structural (isocromosom X sau translocaţie X-autosom); acest tip de inactivare reflectă mai probail o selecţie în favoarea celulelor care au X^N activ şi deci nu există în realitate.
- Femei hemizigote pentru X datorită unei monosomii 45,X (sindromul Turner).
- Femei 46,XY în cadrul unor stări intersexuale (vezi capitolul 14.C).
- Mutaţie nouă (pe cromosomul X^N) la femei purtătoare X^a/X^N.
- Heterogenitate genetică.

d). Riscul genetic. Depistarea heterozigotelor pentru gene RLX

Riscul de recurenţă al bolilor recesive legate de X depinde de genotipul părinţilor şi sexul descendenţilor. Se poate calcula din tabelul 5.7 dar problema esenţială este de a şti dacă o femeie sănătoasă din familia/fratria unui bolnav este sau nu purtătoare. Acest lucru (frecvent în practică pentru distrofia musculară Duchenne) se poate face, pornind de la anamneza familială, pe baza faptului că femeile heterozigote sunt, datorită inactivării unuia din cromosomii X, un mozaic funcţional, cu celule în care este activ X^N şi celule în care este activ X^a şi efectul primar sau secundar al genei mutante se poate identifica la nivel biochimic sau celular. O altă modalitate este analiza directă sau indirectă la nivelul ADN.

2.6. TRANSMITEREA DOMINATĂ LEGATĂ DE X.

Bolile DLX sunt mult mai puţine decât cele RLX şi, cu excepţia particulară a sindromului X fragil, ele sunt foarte rare. Exemplul cel mai cunoscut este rahitismul hipofosfatemic (rezistent la vitamina D) în care se produce o eliminare crescută a fosfaţilor în urină (datorită unei tulburări de reabsorbţie renală), statură mică şi deformări osoase. Alte afecţiuni DLX sunt: condrodisplazia punctata, incontinentia pigmenti, sindromul Goltz, sindromul Rett (despre care se pot obţine detalii prin accesarea OMIM)

Aşa cum am precizat, o boală legată de X este considerată dominantă dacă se exprimă *regulat* la femeile heterozigote (X^AX^n). La bărbaţi nu se pune problema diferenţierii între un caracter dominant sau recesiv legat de X deoarece ei sunt hemizigoţi. Bărbaţii bolnavi (X^AY) vor prezenta însă forme mai grave de boală deoarece la femeile afectate, în marea lor majoritate heterozigote (X^AX^n), inactivarea întâmplătoare face ca 50% din celule să aibe cromosomul X^n activ, fapt ce determină un fenotip mai puţin sever. În unele boli (de exemplu, incontinentia pigmenti[42] tipul 2, sindromul Rett) manifestarea este aproape exclusivă la sexul feminin, deoarece boala este letală la feţii X^AY.

Tabel 5.10. Transmiterea dominantă legată de X a unui caracter patologic.
Sănătoşi (X^nY, X^nX^n) şi bolnavi (X^AY, X^AX^n, X^AX^A)

Combinaţii genotipice parentale	Gameţi	Descendenţi	
		Genotipuri	Fenotipuri
1. X^nY x X^AX^n	$(X^n + Y)$ x $(X^A + X^n)$	X^AX^n, X^nX^n X^AY, X^nY	½ fete bonave şi ½ fete sănătoase ½ băieţi bolnavi şi ½ sănătoşi
2. X^AY x X^nX^n	$(X^A + Y)$ x (X^n)	X^AX^n, X^nY	Toate fetele bolnave, Toţi băieţii sănătoşi
3. X^AY x X^AX^n	$(X^A + Y)$ x $(X^A + X^n)$	X^AX^A, X^AX^n X^AY, X^nY	Toate fetele şi ½ băieţi bolnavi 1/2 băieţi sănătoşi

[42] Pacientele cu incontinentia pigmenti tipul 2 prezintă hiperpigmentări cutanate striate, în vârtejuri, absenţa dinţilor, căderea părului şi uneori tulburări neurologice sau microcefalie cu retard mental; supravieţuirea bolnavelor se corelează cu inactivarea preferenţială a X^A în marea majoritate a celulelor.

4. X^nY x X^AX^A	(X^n + Y) x (X^A)	X^AX^n, X^AY	Toţi copiii (băieţi şi fete) bolnavi
5. X^AY x X^AX^A	(X^A + Y) x (X^A)	X^AX^A, X^AY	Toţi copiii (băieţi şi fete) bolnavi
6. X^nY x X^nX^n	(X^n + Y) x (X^n)	X^NY ; X^NX^N	Toţi copiii sănătoşi

Modelul de transmitere în bolile DLX nu diferă esenţial de transmiterea AD deoarece femeile au o pereche de cromosomi X ca ori ce altă pereche de autosomi; apar, evident, o serie de particularităţi determinate de localizarea genei pe cromosomul X (tabelul 5.10)(figura 5.36). Vom regăsi deci *continuitatea* bolii în succesiunea generaţiilor, determinată de faptul că orice bolnav are (cel puţin) un părinte bolnav. Fiecare copil al unei femei afectate şi heterozigote (X^AX^n) are un risc de 50% de a fi bolnav, indiferent de sex (combinaţia 1 din tabelul 5.10). *Părinţii sănătoşi vor avea copii sănătoşi* (combinaţia 6). Ceea ce este însă caracteristic transmiterii DLX este faptul că *bărbaţii bolnavi (X^AY) vor avea toate fetele afectate şi toţi băieţii sănătoşi* (combinaţia 2; transmiterea tată → fiu este imposibilă) iar în situaţia, mai mult teoretică, a doi bolnavi (femeia heterozigotă) (combinaţia 3) pot rezulta copii sănătoşi, dar *numai băieţi*. Aceste caracteristici determină o frecvenţă generală a femeilor bolnave de două ori mai mare ca a bărbaţilor bolnavi.

3. EREDITATEA MONOGENICĂ NON - MENDELIANĂ

Transmiterea caracterelor monogenice, prin modelele sale şi raporturile de segregare ale genelor alele este, în general, concordantă cu principiile eredităţii mendeliene. Au fost, totuşi, semnalate o serie de excepţii care sunt determinate de mecanisme neobişnuite: mutaţii instabile, disomie uniparentală, amprentare genomică, mozaicism sau ereditate mitocondrială. Ele sunt discutate în detalii şi în alte capitole, dar pentru o viziune unitară a problemei vom face şi aici unele referiri, redundanţa fiind, în opinia noastră, benefică.

3.1. MUTAŢIILE INSTABILE sau DINAMICE

Se consideră, în general, că alelele mutante ce produc boli monogenice mendeliene se transmit *nemodificate* de la părinţi la copii. În anul 1991 au fost descoperite mutaţiile prin expansiunea unor repetiţii trinucleotidice instabile (vezi capitolul 6.B.1.4) care reprezintă un mecanism genetic nou pentru un grup important de boli (vezi capitolul 11.D).

Au fost identificate mai multe gene ce conţin regiuni cu repetiţii trinucleotidice (de exemplu, CGG în *sindromul X fragil,* CTG în *distrofia miotonică* sau CAG în *boala Huntington*. În populaţia generală, numărul de repetiţii variază de la o persoană la alta; când numărul lor depăşeşte o anumită limită, regiunea în care se găsesc devine *instabilă* şi are tendinţa să *crească* în mărime (*premutaţie*), atunci când este transmisă la descendenţi. Expansiunea neobişnuită a repetiţiilor transformă premutaţia în *mutaţie completă* şi produce apariţia manifestărilor clinice ale bolii. Deoarece vârsta de debut şi severitatea bolii sunt direct propoRţionale cu mărimea expansiunii, acest fenomen explică fenomenul de *anticipaţie clinică* observat în acest grup de boli, unde în aceiaşi familie vârsta debutului clinic scade în generaţii succesive. În unele afecţiuni, *gravitatea bolii depinde de sexul părintelui* ce transmite gena mutantă; astfel transmiterea maternă pentru distrofia miotonică şi sindromul X fragil sau paternă pentru boala Huntington - produc forme mai severe de boală.

3.2. DISOMIA UNIPARENTALĂ

Un alt mecanism neobişnuit implicat în producerea bolilor genetice este disomia uniparentală (DUP), în care ambele copii ale unui anumit cromosom provin numai de la unul din părinţi. Deobicei DUP se produce prin pierderea unui cromosom de către un zigot care a fost iniţial trisomic. În funcţie de originea trisomiei (nedisjuncţie în mieoza I sau în meioza II) (vezi figura 5.20)şi cromosomul pierdut există trei posibilităţi:

- zigot disomic normal, cu câte un cromosom de la fiecare din părinţi;
- zigot cu DUP şi doi cromosomi identici de la un părinte (isodisomie);
- zigot cu DUP şi doi cromosomi diferiţi de la un părinte (heterodisomie).

DUP nu are consecinţe clinice prin ea însăşi ci prin faptul că isodisomia poate realiza o stare de *homozigoţie a unei gene recesive* ce există sub formă heterozigotă numai la unul din părinţi. S-au descris cazuri de fibroză chistică în care ambele gene mutante provin de la două copii identice ale cromosomului 7 matern. De asemenea, au fost semnalate cazuri de hemofilie A în care ambii cromosomi X şi Y ai unui băiat bolnav provin de la tatăl afectat sau boala se manifestă la o fată homozigotă (prin isodisomia X^a) născută din părinţi X^aX^N şi X^NY.

DUP poate avea efecte patologice atunci când cromosomul implicat conţine una sau mai multe *gene amprentate*. De exemplu, în s**indromul Beckwith-Wiedemann** (OMIM 130650) - caracterizat prin gigantism, macroglosie, omfalocel şi predispoziţie pentru dezvoltarea unor tumori - boala este asociată cu *expresia bialelică* (prin isodisomie) a genei pentru *factorul de crestere similar insulinei tip 2* (IGF2), genă situată pe cromosomul 11p15.5 şi exprimată în mod normal[43] numai de pe cromosomul patern (bolnavul are ambii cromosomi 11 de la tată).

3.3. AMPRENTAREA PARENTALĂ (GENOMICĂ).

În transmiterea mendeliană se pleacă de la premiza că acţiunea genei este independentă de originea sa maternă sau paternă; când se formează un zigot, genele "par a uita" originea lor parentală. În mod obişnuit o alelă mutantă a unei gene autosomale este transmisă cu o *probabilitate egală* de la unul din părinţi, indiferent de sex, la un copil de un sex sau altul. Există însă situaţii rare în care expresia unei gene mutante şi deci a bolii este *diferită în funcţie de originea ei,* maternă sau paternă. Această diferenţă de expresie între alela moştenită de la tată şi alela moştenită de la mamă este produsă prin **amprentare parentală** sau **genomică** (vezi capitolul 4.D.1.2). Amprentarea este o formă de inactivare a genei ce produce o expresie monoalelică dar *nu este o mutaţie,* deoarece este reversibilă.

Amprentarea se produce în gametogeneză, inainte de fecundare, marcând originea maternă sau paternă a a numitor gene. După concepţie expresia genei amprentate este suprimată în anumite ţesuturi şi se menţine ca atare toată viaţa; excepţie fac celulele germinale în care se produce o conversie a amprentării funcţie de sex: la bărbat, alelele moştenite de la mamă, cu amprentare maternă, vor fi convertite în gametogeneză şi vor fi trecute descendenţilor cu amprentare paternă.

Amprentarea este un mecanism normal de reglarea genică care nu produce, prin el însăşi, o boală ereditară dar poate explica penetranţa incompletă sau expresivitatea variabilă a unei afecţiuni monogenice.

De exemplu, tumora de glomus carotidian, transmisă AD, la care subiecţii purtători de genă mutantă sunt bolnavi sau sănătoşi după cum ei au primit gena de la tată sau de la mamă; deci gena mutantă este *activă* dacă o transmite tatăl sau *inactivă* dacă provine de la mamă.

Amprentarea genomică implică numai un număr mic de gene. Sunt cunoscute mai multe regiuni cromosomice (care conţin peste 40 de gene amprentate) situate pe: *7q matern, 11p patern, 14q matern, 15q matern, 15q patern, etc.* În ciuda numărului relativ mic de gene amprentate, tulburarea modului corect de expresie monoalelică (datorată UPD, deleţiei cromosomice / genice sau pierderii amprentării) s-a dovedit a avea consecinţe serioase în dezvoltarea embrionară, boli genetice şi cancer. Cel mai amplu exemplu studiat (vezi capitolul 4.D.1.2) îl reprezintă sindroamele Prader-Willi (SPW) şi Angelman (SA) produse, în mod obişnuit (dar nu exclusiv ; vezi tabelul 5.11), de aceeaşi deleţie a cromosomului 15q11-13, dar pe cromosomul de origine paternă (SPW) sau maternă (SA).

Tabel 5.11. Fenotipurile şi cauzele sindroamelor Prader-Willi şi Angelman

	Sindromul Prader - Willi	**Sindromul Angelman**
Fenotip	Hipotonie neonatală severă, dismorfie facială caracteristică, mâini şi picioare mici, talie mică, obezitate cu debut în copilărie, retard mintal, tulburări de comportament	Dismorfie facială carcteristică, talie mică, microcefalie, retard mintal sever, spasticitate şi convulsii, lipsa vorbirii şi crize de râs.
Deleţie 15q11-13	~ 70% cazuri cu deleţie pe cromosomul patern	~ 70% cazuri cu deleţie pe cromosomul matern
Disomie uniparentală	~ 30% cazuri (maternă)	~ 3-5 % cazuri (paternă)

[43] Alela maternă este represată , prin metilare

Gene incriminate	*SNRPN şi necdina*, ambele cu expresie de pe cromosomul patern.	*UBE3A* care este exprimată exclusiv matern, la nivel cerebral.
Mutaţie genică	Neidentificată	7-9 % cazuri
Mutaţie în centrul de amprentare	1-2 % cazuri	7-9 % cazuri
Alte cauze	Neidentificate	10-20 % cazuri

3.4. MOZAICISMUL

Mozaicismul este definit ca prezenţa la un individ a cel puţin două linii celulare diferite genetic dar derivate dintr-un singur zigot (prin aceasta se deosebeşte de himeră, formată prin unirea a doi zigoţi ce vor forma un singur embrion; vezi 5.C.3).

Mozaicismul prezintă următoarele caracteristici:

- poate implica un cromosom întreg (aneuploidie) sau o singură genă (mutaţie);
- este un *eveniment postzigotic* care se produce într-o singură celulă;
- o dată ce modificarea genetică a fost generată şi nu este letală, ea va fi trasnsmisă celulelor fiice, formându-se o *clonă* celulară anormală;
- procesul se poate produce în perioade diferite ale dezvoltării ontogenetice: în stadiul embrionar, în viaţa fetală sau postnatal; *momentul de producere* va determina *proporţia* relativă a celor două clone şi prin aceasta *severitatea* modificărilor fenotipice cauzată de clona anormală.

Nu vom discuta mozaicismul cromosomic, produs de o eroare postzigotică în mitoză (vezi 4.B.2.3) şi nici nu vom mai insista asupra mozaicismului funcţional care se întâlneşte la femei, prin inactivarea unuia din cei doi cromosmi X. Ne vom referi doar la mutaţiile genice produse în celulele somatice, care pot produce un *fenotip segmental* sau neuniform (în „pete"). **Mozaicismul somatic** este o cauză majoră a multor forme de cancer (vezi capitolul 17) dar a fost semnalat şi în unele boli monogenice „clasice", ca de exemplu neurofibromatoza 1 *segmentală* (ce afectează numai o parte a corpului iar părinţii pacientului sunt normali) în unele boli legate de X (hemofilia A, distrofia musculară Duchenne, deficienţa în ornitin transcarbamilază) sau în unele tulburări de morfogeneză.

Există şi un **mozaicism germinal** sau **gonadic** care explică transmiterea unei boli genetice la mai mulţi copii de către părinţi normali. Mutaţia se produce în perioada precoce a dezvoltării embrionare (este deci o mutaţie somatică) în celulele precursoare ale gameţilor, care efectuează un număr de diviziuni mitotice (câteva sute la embrionul masculin), ceea ce face ca o anumită proporţie de gameţi să posede mutaţia. Mozaicismul germinal a fost documentat în circa 6% din formele letale de osteogenesis imperfecta (figura 5.37), la 15% din mamele (nepurtătoare !) copiilor cu distrofie musculară Duchenne sau în unele cazuri de hemofilie A. Posibilitatea mutaţiilor germinale face dificilă excluderea completă a riscului de recurenţă în boli recesive legate de X, la care testele de identificare a stării de purtător la mamă sunt normale, sau în bolile autosomal dominante în care părinţii sunt clinic şi genetic neafectaţi dar din fericire acest risc este mic (3-4%).

3.5. TRANSMITEREA PE LINIE MATERNĂ

În capitolul 2.C.3 am prezentat structura ADN mitocondrial şi am precizat că acesta poate suferi mutaţii producând o serie de boli degenerative, care sunt *transmise într-un mod specific, de la mamă la toţi descendenţii; bărbaţii bolnavi nu transmit boala.* Explicaţia acestui mod particular de transmitere, pe linie maternă, este reprezentată de faptul că numai ovulul va furniza zigotului citoplasmă şi mitocondrii. Bolile produse de mutaţii în ADNmt vor fi prezentate în capitolul 12.

E. EREDITATEA POLIGENICĂ ŞI MULTIFACTORIALĂ

Numeroase caractere normale şi anormale (calitative sau cantitative) sunt prezente la mai mulţi indivizi dintr-o familie, desi nu sunt determinate monogenic (tabelul 5.12). Această *agregare familială* poate fi explicată prin faptul că membrii aceleiaşi familii au un număr mai mare de gene în comun. Dar aceasta nu este singura explicaţie a unor trăsături comune într-o familie. Nu trebuie

uitat că membrii unei familii trăiesc în aceleaşi condiţii de mediu socio-economic şi cultural şi nici posibilitatea ca, uneori, o aceeaşi boală să apară din întâmplare la mai multe persoane din aceiaşi familie. Totuşi, majoritatea caracterelor familiale non-mendeliene sunt determinate de acţiunea combinată a unor factori genetici, reprezentaţi de mai multe gene nealele (poligenie), şi a unor factori de mediu. Deci, *ereditatea lor este complexă, multifactorială*.

O caracteristică primară a bolilor multifactoriale este aceea că indivizii afectaţi tind să se grupeze în familii (agregare familială). Specialiştii în epidemiologie genetică trebuie să stabilească dacă o agregare familială observată în anumite boli este determinată de factori genetici, să evalueze contribuţia lor şi în final să identifice locii şi alelele implicate în aceste boli multifactoriale.

Tabelul 5.12. Caractere multifactoriale normale şi anormale

Caractere normale	Caractere anormale
- culoarea pielii şi a părului - culoarea ochilor - înălţimea - dermatoglifele - coeficientul de inteligenţă - habitusul - fizionomia feţei - personalitatea individului	- despicătura labio-palatină - defectele de tub neural - malformaţiile congenitale de cord - luxaţia congenitală de şold - schizofrenia - boala coronariană - diabetul zaharat - cancerul de sân, cancerul de colon, etc

4.1. STABILIREA NATURII GENETICE A UNUI CARACTER FAMILIAL NON-MENDELIAN

Stabilirea naturii genetice a unui caracter familial non-mendelian, care ar putea fi un caracter multifactorial, se realizează prin trei metode esenţiale: determinarea şi măsurarea agregării familiale, studiul gemenilor şi studiile de adoptaţie.

a). Măsurarea agregării familiale

Cea mai directă metodă pentru evidenţierea unui determinism genetic este să stabilim că un anumit *caracter calitativ/boală* este familial, se manifestă la mai mulţi membri din familie. Când doi indivizi dintr-o familie au aceeaşi boală ei se numesc **concordanţi** pentru boala respectivă. Când, într-o pereche de indivizi înrudiţi, numai unul este afectat şi celălalt nu, ei se numesc **discordanţi** pentru boala dată. *Gradul de agregare familială* poate fi măsurat prin compararea frecvenţei caracterului / bolii la rudele unei persoane afectate (proband) cu frecvenţa în populaţia generală. **Rata riscului relativ** (λ_r) este definită prin raportul dintre prevalenţa bolii la rudele unei persoane afectate (r) şi prevalenţa bolii în populaţia generală.

$$\lambda_r = \frac{\text{Prevalenţa bolii la rudele unei persoane afectate "r"}}{\text{Prevalenţa bolii în populaţia generală}}$$

Valoarea lui λ_r exprimă nivelul agregării familiale în funcţie de riscul recurenţei bolii în familie şi de prevalenţa ei în populaţia generală[44]. Cu cât λ_r este mai mare cu atât agregarea familială este mai pronunţată (tabelul 5.13). O rată $\lambda_r = 1$ indică faptul că persoana înrudită nu are un risc mai mare decât orice individ din populaţia generală de a dezvolta boala. Rata riscului relativ se poate măsura pentru diferite clase de înrudire; de exemplu, pentru gemeni MZ, rude de gradul I (λ_f pentru fratrie) etc.

Tabelul 5.13.Rata de risc relativ (λ_r) pentru rudele probanzilor cu unele boli familiale şi ereditate multifactorială.

(adaptat după Nussbaum et al, 2001)

Boala	Gradul de înrudire	λ_r
Autism	Gemeni monozigoţi Fraţi	2000 150

[44] Utilizarea acestui parametru – prevalenţa în populaţie – este importantă deoarece o boală frecventă în populaţie are şanse mai mari să apară prin coincidenţă la mai mulţi membri din familie

Diabet zaharat tip I	Gemeni monozigoţi Fraţi	80 12
Psihoza maniaco-depresivă	Gemeni monozigoţi Fraţi	60 7
Schizofrenia	Gemeni monozigoţi Fraţi	48 12

Este firesc ca incidenţa unei boli multifactoriale şi λ_r să fie concordante cu gradul de rudenie (tabelul 5.14). Dacă există o predipoziţie genetică la o boală este firesc ca λ_r să fie mai mare la gemenii monozigoţi (MZ) – cu aceiaşi ereditate – şi apoi să scadă la rudele de gradul I (cu ½ gene în comun) şi, mai mult , la rudele de gradul II (cu ¼ gene în comun).

Tabelul 5.14. Riscul familial în schizofrenie (modificat după Strachan şi Read, 1999)

Grad de rudenie	Incidenţă	λ_r
Copii	12,31 %	15,4
Fratrie	8,51 %	10,6
Nepoţi, nepoate	2,81 %	3,5
Veri primari	2,91 %	3,6
Unchi, mătuşe	2,01 %	2,5

O altă metodă de evaluare a agregării familiale este reprezentată de **studiile caz-control**. În care pacienţii cu boală (*cazurile*) sunt comparaţi (istoric familial, expuneri la factori de mediu, ocupaţie, poziţie geografică, paritate etc) cu indivizi fără boală (*control*) (de exemplu soţiile, ce trăiesc în acelaşi mediu). Pentru a determina o posibilă contribuţie genetică la agregarea familială a bolii, se compară frecvenţa bolii în familia cazului cu frecvenţa ei la rudele lotului control. Studiile caz-control sunt dificile şi pasibile la erori de recenzare, alegerea loturilor etc.

În cazul *caracterelor cantitative* ele nu mai pot fi clasificate în „prezente sau absente" ci vor trebui măsurate. În consecinţă nu se mai poate compara prevalenţa bolii la rude versus control ci se măsoară *coeficientul de corelaţie*, adică tendinţa ca o anumită valoare a măsurătorii paramerului analizat să fie asemănătoare în loturile evaluate

b). Studiile gemenilor

Pentru evaluarea rolului eredităţii şi mediului la om, gemenii sunt subiecţi ideali, adevărate "experimente naturale" (Fr. Crick sugera, cu ironie, că fiecare pereche de gemeni ar trebui...donată ştiinţei pentru studiu). Gemenii dizigoţi (DZ) permit măsurarea concordanţei bolilor la doi indivizi înrudiţi care cresc şi trăiesc în acelaşi mediu dar care sunt diferiţi din punct de vedere genetic, proporţia de gene comune fiind de 50%. Gemenii monozigoţi (MZ) au genotip identic şi pot creşte şi trăi împreună sau nu. Dacă vor trăi în condiţii de mediu diferite acestea vor fi responsabile de diferenţele în apariţia bolilor în cursul vieţii lor.

Gemenii monozigoţi provin prin clivajul timpuriu în embriogeneză (în primele 14 zile după concepţie[45]) al unui singur zigot. Ei vor avea întotdeauna acelaşi sex şi vor fi identici din punct de vedere genetic exceptând posibilele mutaţii somatice post-zigotice (mai frecvente în dezvoltarea celulelor sistemului imun), numărul moleculelor de ADN mitocondrial sau modelul de inactivare a cromosomului X (dacă sunt de sex feminin).
Gemenii dizigoţi se dezvoltă din două ovule diferite, fiecare dintre ele fertilizate de către un spermatozoid; au acelaşi sex sau sexe diferite (în proporţii egale) şi, din punct de vedere genetic, sunt diferiţi sau tot atât de asemănători ca fraţii obişnuiţi, având numai jumătate din alelele lor identice (se mai numesc şi gemeni fraterni). Frecvenţa naşterilor gemelare variază între 0,5 – 2 %. În general se apreciază că 1/3 din toţi gemenii sunt MZ iar 2/3 sunt DZ din care 1/2 sunt de acelaşi sex, 1/2 sunt de sex diferit.
Diagnosticul gemelarităţii, necesar pentru gemenii de acelaşi sex, necesită evaluarea atentă a multor caracteristici: aspectul placentei, numărul membranelor amniotice şi corionice; morfologia corpului, dermatoglifele; markerii serologici şi, cel mai sigur, markerii ADN polimorfici. Toţi gemenii dizigoţi au doi saci amniotici şi doi saci corionici (ei pot fuziona secundar dar circulaţia fiecărei părţi a placentei rămâne separată). Natura membranelor fetale la gemeniii MZ depinde de momentul separării. La 75% din MZ există

[45] . O diviziune apărută foarte târziu, după a 14-a zi de la concepţie poate da naştere la gemeni uniţi (care apar cu o frecvenţă de 1/50000 de sarcini) cum sunt *siamezii*...numiţi astfel în memoria celebrilor Chang şi Eng, născuţi în 1811 în Thailanda (*Siam*) şi uniţi prin abdomenul comun.

un singur amnios şi un singur corion; restul de 25% au două membrane corionice şi nu pot fi deosebiţi în acest caz de gemenii DZ. Diagnosticul de gemelaritate este pus de baza unor markeri serologici şi ADN identici.

Studiile gemenilor sunt adesea folosite pentru a distinge trăsăturile multifactoriale de cele monogenice sau de cele cauzate de factori negenetici:

- Deoarece gemenii monozigoţi au toate genele lor comune, ei vor fi 100% concordanţi pentru transmiterea tuturor bolilor monogenice. Gemenii dizigoţi vor avea o concordanţă de 50% pentru trăsăturile dominante monogenice şi de 25% pentru cele recesive.
- O concordanţă *sub 100% la gemenii MZ* este o dovadă clară că *factori negenetici au un rol în producerea bolii* şi că avem de a face mai degrabă cu o trăsătură multifactorială.
- Concordanţa trăsăturilor multifactoriale este diferită după tipul de gemelaritate. (Tabel 5.15). *Cu cât procentul de concordanţă la MZ este mai mare decât la DZ cu atât o componentă genetică a bolii este mai pronunţată.* Această observaţie este cu atât mai valabilă cu cât boala este manifestă la naştere sau cât mai curând după naştere. Cu cât debutul este mai tardiv, cu atât posibilitatea intervenţiei unor factori de mediu este mai mare.
- Gemenii *MZ despărţiţi la naştere* şi crescuţi separat permit geneticienilor o bună observaţie a concordanţei îmbolnăvirilor la indivizi identici genetic, crescuţi sub influenţa unor factori de mediu diferiţi. Asemenea studii au permis demonstrarea rolului mediului în producerea unor boli psihice cum ar fi: alcoolismul sau abuzul de droguri.

Tabel 5.15 Concordanţa unor trăsături între gemenii monozigoţi şi dizigoţi (Emery and Rimoin, 1997)

Caracter	Procentul de concordanţă	
	Gemeni monozigoţi	Gemeni dizigoţi
Diabet zaharat insulino-independent	100	10
Înălţimea	95	52
Nr. crestelor digitale	95	49
IQ	90	60
Psoriazis	72	15
Epilepsia idiopatică	70	6
Psihoza maniaco-depresivă	67	5
Retard mintal cu IQ < 50	60	3
Schizofrenia	53	15
Diabet zaharat insulino-dependent	50	5
Astmul bronşic	47	24
Luxaţia cong. de şold	40	3
Despicătura labio-palatină	38	8
Artrita reumatoidă	34	7
Piciorul strâmb	33	3
Hipertensiunea arterială	25	7
Stenoza pilorică	15	2
Cancerul cu aceeaşi localizare	7	3
Spina bifida	6	3

Heritabilitatea (simbolizată prin h^2) este o noţiune cantitativă ce măsoară amploarea cu care diferitele alele ale unor loci sunt responsabile de variabilitatea (varianţa) unui caracter cantitativ dat, în populaţie sau printre rudele cu un anumit grad de înrudire: părinţi-copii, fratrie, gemeni MZ şi DZ. Ulterior conceptul de heritabilitate a fost extins şi la caractere calitative pentru a exprima cota de participare a eredităţii.

Heritabilitatea este estimată prin *gradul de asemănare dintre rude* exprimat în forma unui coeficient de corelaţie. O soluţie alternativă de calcul se bazează pe calcularea ratelor de concordanţă la gemenii MZ şi DZ; formula de calcul este:

$$h^2 = \frac{\text{Concordanţa la } \mathbf{MZ} - \text{concordanţa la DZ}}{\text{Concordanţa la DZ}}$$

Valoarea h^2 variază între 0 – dacă genele nu contribuie la variaţia fenotipică totală a caracterului – şi 1, dacă genele sunt responsabile exclusiv de determinismul acelui caracter. Deci, cu cât

heritabilitatea este mai mare, cu atât mai mare este contribuţia factorilor genetici la realizarea caracterului respectiv (tabel 5.16). De precizat că acest concept teoretic nu dă informaţii privind numărul de gene implicate sau mecanismul lor de acţiune.

Tabel 5.16 Estimarea heritabilităţii în diferite boli

Boală	Frecvenţă %	Heritabilitate
Schizofrenie	1,0	85
Astm bronşic	4,0	80
Despicături labiale±palatine	0.1	76
Stenoză pilorică	0,3	75
Spondilită anchilozantă	0,2	70
Picior strâmb	0,1	68
Boală coronariană	3,0	65
Hipertensiune esenţială	5,0	62
Luxaţie congenitală de şold	0,1	60
Anencefalie şi spina bifida	0,3	60
Ulcer peptic	4,0	37
Boala congenitală de cord	0,5	35

Limitele studiilor gemenilor.

Studiul gemenilor este o metodă ideală pentru evaluarea rolului eredităţii şi mediului în producerea unor boli dar a adus puţine contribuţii majore în genetica umană. Există nu numai limite numerice (puţine cupluri disponibile) ci şi ştiinţifice. Astfel, gemenii MZ nu au exact aceeaşi expresie a genelor cu toate că ei au genotipul identic: de exemplu, inactivarea întâmplătoare a cromosomilor X după clivarea unui zigot în doi gemeni monozigoţi feminini produce diferenţe semnificative în expresia alelelor genelor de pe cromosomul X, în diferite ţesuturi. Apoi, expunerea la factorii de mediu nu este întotdeauna identică pentru gemeni, mai ales la vârsta de adult, odată cu părăsirea căminului copilăriei. Mai mult, chiar şi intrauterin, mediul nu este absolut identic. Gemenii MZ, mono- sau di-placentari pot avea irigare sangvină placentară diferită, dezvoltare intrauterină diferită şi deci greutate la naştere diferită.

c). Studiile de adopţie.

Studiul copiilor adoptaţi este probabil *cea mai bună metodă* pentru estimarea contribuţiei factorilor genetici în determinismul bolilor multifactoriale. Studiul constă în compararea ratei unor îmbolnăviri la copiii adoptaţi ai unor părinţi afectaţi cu rata de îmbolnăvire a unor copii adoptaţi ai unor părinţi ne afectaţi. De exemplu, copiii adoptaţi ai unor părinţi schizofrenici, fac şi ei boala în proporţie de 8-10%, în timp ce copiii adoptaţi ai unor părinţi ne afectaţi, dezvoltă boala numai în proporţie de 1%. Dificultăţile studiilor de adopţie sunt reprezentate de lipsa frecventă a informaţiilor despre familia biologică, combinată cu plasamentul selectiv al copiilor adoptaţi.

De subliniat că atât studiul gemenilor cât şi studiul adopţiilor sunt metode limitate care nu pot prin ele însele aduce argumente decisive în ce priveşte rolul genelor în determinismul trăsăturile multifactoriale şi nici nu pot identifica genele specifice ale bolii. Aceste studii servesc numai ca indicii preliminare privind rolul componentelor genetice în producerea bolii.

4.2. TEORIILE CARE EXPLICĂ DETERMINISMUL GENETIC AL CARACTERELOR MULTIFACTORIALE

a). Ereditatea poligenică a caracterelor cantitative cu distribuţie continuă (normală sau gaussiană).

Orice caracter fiziologic care poate fi măsurat (talia, greutatea, perimetrul cranian, tensiunea arterială, colesterolul seric, inteligenţa) este un *caracter cantitativ*. Ereditatea caracterelor cantitative este distinctă de ereditatea monogenică a caracterelor calitative dar poate fi descrisă în termeni mendelieni dacă se acceptă teoria lui Fisher (1918) a **eredităţii poligenice**. Potrivit acestei teorii:

- un caracter cantitativ este determinat de acţiunea *simultană a mai multor gene nealele* (loci);

- genele au efecte *cantitative, mici şi aditive*/cumulative (spre deosebire de cele monogenice a căror efect este important şi calitativ);
- genele acţionează independent unele de altele, între ele nu există relaţii de dominanţă şi recesivitate;
- caracterele cantitative poligenice prezintă în populaţie o *distribuţie normală***,** continuă (gaussiană, în formă de clopot) (figura 5.38), spre deosebire de caracterele monogenice a căror distribuţie în populaţie este totdeauna *discontinuă*;

  Curbele de distribuţie normală (gaussiană) se caracterizează prin doi parametri: media (ce determină înalţimea curbei) şi depărtarea faţă de medie (deviaţia standard - DS); circa 68%, 95% şi 99.7% din observaţii se încadrează în medie ± una, două sau trei deviaţii standard.
- Expresia fenotipică a caracterelor poligenice poate fi **influenţată de factorii de mediu**.
- Deoarece rudele au gene în comun, funcţiile lor sunt corelate şi mărimea corelaţiei este dependentă de gradul de rudenie.

Efectul aditiv al mai multor gene şi distribuţia normală a caracterului determinat de acestea se pot demonstra cu câteva exemple clasice: pigmentaţia pielii, înălţimea, numărul de creste digitale, tensiunea arterială etc. Înainte de a prezenta unele dintre ele vom preciza faptul că folosirea conceptului de distribuţie normală a unor caractere morfo-fiziologice cantitative este fundamentală pentru medicina clinică, deoarece permite stabilirea unor standarde normale (de vârstă, sex) pentru caracter şi identificarea, prin comparaţie, a unor valori anormale Astfel se conturează un grup de **boli multifactoriale definite clinic cantitativ**, care sunt de fapt valori extreme (± 2 DS) ale distrinuţie continue a unui caracter normal: hipostatura, obezitatea, unele forme de retard mintal, hipertensiunea arterială esenţială.

Exemplul 1: Pigmentaţia pielii

- Caracterul depinde de cantitatea de **melanină**, un pigment de culoare brună-neagră, depozitat sub formă de granule în celulele tegumentului, în fanere, coroidă. Pigmentaţia pielii variază de la o populaţie la alta; selecţia naturală fixează cea mai favorabilă combinaţie de gene, în funcţie de condiţiile de mediu (ex. populaţia scandinavă din zone cu puţine zile însorite are o foarte redusă cantitate de pigment, în timp ce populaţia de la tropice are, din contră, o mare cantitate de pigment care protejează organismul de radiaţia solară intensă). Caracterul este determinat de un număr de 2-6 gene.
- În situaţia cea mai simplă (figura 5.39), presupunem intervenţia a 2 perechi de gene alele: **Aa** şi **Bb**, din care genele **A** şi **B** determină o cantitate de pigment egală cu **1** iar genele **a** şi **b** determină o cantitate de pigment egală cu zero. Negrii, homozigoţi dominanţi (**AA** ; **BB**) vor avea o cantitate de pigment egal cu **4**, iar albii, homozigoţi recesivi (**aa** ; **bb**), o cantitate de pigment egal cu ***0***. Din căsătoria între un alb şi un negru, rezultă totdeauna mulatri (**Aa** ; **Bb**). Din căsătoria între 2 mulatri, pot apărea: negri (N), mulatri închişi (MI), mulatri (M), mulatri deschişi (MD), şi albi (A), în proporţia 1:4:6:4:1 (tabelul 5.17). În ipoteza în care caracterul ar fi determinat de 3 alele independente, proporţia ar fi 1: 6: 15: 20 :15 : 6 : 1, ş.a.m.d.

Tabelul 5.17 Rezultatul combinaţiilor dintre doi mulatri

Gameţi	**AB = 2**	**Ab = 1**	**aB = 1**	**ab = 0**
AB = 2	AA;BB = 4 **N**	AA;Bb = 3 **MÎ**	Aa;BB = 3 **MÎ**	Aa;Bb = 2 **M**
Ab = 1	AA;Bb = 3 **MÎ**	AA;bb = 2 **M**	Aa;Bb = 2 **M**	Aa;bb = 1 **MD**
aB = 1	Aa;BB = 3 **MÎ**	Aa;Bb = 2 **M**	aa;BB = 2 **M**	aa;Bb = 1 **MD**
ab = 0	Aa;Bb = 2 **M**	Aa;bb = 1 **MD**	aa;Bb = 1 **MD**	aa;bb = 0 **A**

- Faptul că în prima generaţie apar numai mulatri, ne-ar putea face să credem că pigmentaţia este controlată de o singură pereche de gene. Dacă ar fi aşa, atunci, în generaţia a II-a, conform legilor mendeliene, ar trebui să apară un procent egal de albi şi negri. Dar raportul observat este diferit, singura explicaţie plauzibilă fiind aceea că pigmentaţia este condiţionată de 2 sau mai multe gene, având efect aditiv, numărul lor exact nefiind încă cunoscut. Printre genele candidat se numără cele ce codifică receptorii membranri pentru melanocortină şi proteina melanosomală P, precum şi genele pentru tirozinazele melanogenice TRP1 şi TRP2.

- În realizarea culorii pielii intervin însă, în afară de cantitatea de pigment, determinată de un număr mai mare de gene, şi alţi factori ce ţin de individ (sex, vârstă, grosimea tegumentului...), sau de mediu (alimentaţie, lumina solară...). De aceea determinismul acestui tip de caractere este numit, în mod obişnuit, **poligenic, multifactorial**.

Exemplul 2: Înălţimea populaţiei

- Reprezentarea grafică a înălţimii populaţiei este o curbă de tip gaussian, caracteristică distribuţiei continue, normale (figura 5.40). Se poate vedea că faţă de înălţimea medie de 170 cm., valorile sunt repartizate simetric de o parte şi alta a mediei, curba de distribuţie luând aspect de clopot. Care este explicaţia acestei distribuţii?
- Presupunem (ne-realist) că înălţimea ar fi determinată de o singură genă cu 2 alele *A* şi *a*. Alela *A* tinde să producă indivizi cu talie înaltă, alela *a* indivizi cu talie joasă. Dacă nu există o dominanţă la acest locus, cele 3 genotipuri posibile (*AA, Aa, aa*) vor produce 3 fenotipuri: înalt, mediu şi scund. Presupunând că frecvenţa genelor *A* şi *a* în populaţie este 0,5 pentru fiecare, distribuţia, grafic reprezentată, va fi cea din figura 5.41.a.
- Presupunem acum, mai realist, că talia este determinată de doi loci, cel de al doilea de asemenea cu două alele: *B* pentru talia înaltă şi *b* pentru talia scundă. Ele influenţează talia exact ca şi alelele *A* şi *a*. Acum sunt 9 posibilităţi genotipice şi 5 posibilităţi fenotipice după cum individul va avea 0, 1, 2, 3 sau 4 alele pentru talia înaltă. Distribuţia în populaţie încă nu este una normală dar este mult mai apropiată de o distribuţie normală decât în cazul anterior cu o singură genă. (figura 5.41.b)
- Şi, în sfârşit, dacă extindem exemplul la situaţia în care mai multe gene şi factori de mediu influenţează înălţimea, fiecare având un efect redus, rezultă mai multe fenotipuri posibile, fiecare puţin diferit de celălalt, iar distribuţia în populaţie dezvoltă o curbă în formă de clopot. (figura 5.41c)

Din exemplele prezentate se poate concluziona că *un fenotip care are o distribuţie normală în populaţia generală poate fi produs de ereditatea poligenică*, implicând acţiunea mai multor gene, cu efecte aditive. Trebuie subliniat faptul că genele individuale care stau la baza unor caractere cantitative poligenice, multifactoriale, se transmit conform principiilor mendeliene ale segregării şi asortării independente. Singura deosebire este aceea că ele *acţionează împreună* pentru a determina caracterul respectiv.

Pentru efectul aditiv al mai multor gene pledează şi **studiul corelaţiilor familiale** pentru caractere cantitative. *Corelaţia* este o măsură statistică a gradului de asociere al unor fenomene variabile sau, mai simplu, o măsură a gradului de asemănare sau de relaţie între doi parametri. De exemplu, pornind de la faptul că rudele de gradul I au 50% din gene în comun se poate presupune că un caracter este poligenic (talie, inteligenţă etc) atunci corelaţia dintre rude le de gradul I, ca de exemplu părinţi-copii, frate-frate, ar trebui să fie 0,5. Această premisă teoretică a fost validată de studiile care au arătat o corelaţie frate-frate apropiată de 0,5 pentru înălţime, QI, număr de creste digitale. Totuşi, diferite studii ale unor caractere cantitative au evidenţiat „*o regresie faţă de medie*”. De exemplu, părinţi care sunt înalţi sau inteligenţi au copii a căror înălţime sau inteligenţă medie este *mai mică* decât media valorilor parentale; dacă aceste caractere ar fi pur poligenice atunci datele obţinute la descendenţi ar trebui să se plaseze în jurul mediei valorilor parentale. Or, în realitate, caracterele umane cantitative pot fi influenţate de mediu şi este de asemenea posibil ca unele gene implicate să nu aibe efecte aditive şi să acţioneze dominant. Toate acestea sugerează existenţa altor modele de explicaţie a eredităţii multifactoriale.

b). Ereditatea poligenică cu prag a caracterelor discontinue.

În genetica medicală multe malformaţii congenitale şi boli comune ale adultului (tabelul 5.12) au o distribuţie familială şi nu prezintă un model de transmitere monogenică. De aceea, firesc, s-a presupus că ele sunt poligenice, multifactoriale, dar – spre deosebire de caracterele cantitative care au o distribuţie continuă în populaţie – ele prezintă *o distribuţie discontinuă* (fiind prezente sau absente la o persoană dată, întocmai ca şi caracterele monogenice). Pentru a explica producerea acestor caractere multifactoriale discontinue, Falconer (1971) a extins teoria poligenică, postulând existenţa unei *susceptibilităţi variabile la boală, cu o distribuţie continuă în populaţie care prezintă însă un prag* care trebuie trecut, depăşit, pentru ca boala să se manifeste (figura 5.42). Sub prag, individul este aparent normal; peste prag el poate fi afectat.

Modelul poligenic cu prag al susceptibilităţii la boală presupune că bolnavii au moştenit o combinaţie „nefericită” de gene de risc. Deoarece rudele lor posedă un număr de gene în comun este logic să presupunem că au şi ele o susceptibilitate crescută, un risc mai mare de boală, comparativ cu populaţia generală; de aceea *bolile respective au un caracter familial.* Astfel, urmărind proporţia rudelor afectate în familii cu despicătură labio-palatină (tabelul 5.17) se poate observa că:

- proporţia gemenilor monozigoţi afectaţi este de circa 40%, comparativ cu proporţia de 4% pentru gemenii dizigoţi;
- proporţia pentru indivizii cu copii afectaţi este identică cu cea pentru fraţi afectaţi;
- există o scădere netă a proporţiei rudelor afectate, în funcţie de gradul de rudenie: o scădere de 10 ori de la gemeni monozigoţi la gemeni dizigoţi, o scădere de 7 ori de la rude de gradul I la rude de gradul II, o scădere de 2,5 ori de la rudele de gradul II la rudele de gradul III. Deci, frecvenţa bolii multifactoriale în familie scade cu reducerea gradului de înrudire, ajungând a fi identică cu cea din populaţia generală

Tabelul 5.18 - Proporţia rudelor afectate în despicătura labio-palatină (Chen, 1988)

Grad de rudenie	Afectaţi	Proporţia de afectaţi	Factorul de risc faţă de populaţia generală
Gemeni	MZ DZ	~ 40% 4%	
Gradul I	Fraţi Copii	3,2 - 4,9% 3,0 - 4,3%	40 x
Gradul II	Mătuşi şi unchi Nepoţi şi nepoate	0,6 - 0,8% 0,7 - 0,8%	7 x
Gradul III	Veri primari	0,3%	3 x
Neînrudit	Populaţia generală	0,1%	1 x

Aceste date ne permit să prezentăm **modelul susceptibilităţii cu prag** (figura 5.42). Conform acestui model, toţi factorii care influenţează dezvoltarea unor afecţiuni multifactoriale, fie ei genetici sau de mediu, pot fi consideraţi ca o singură entitate, cunoscută ca **susceptibilitate**. Susceptibilitatea tuturor indivizilor într-o populaţie formează o variabilă continuă care are o distribuţie normală atât în populaţia generală cât şi la rudele individului afectat. Curba de distribuţie prezintă însă un prag dincolo de care indivizii au mai multe gene de risc şi deci o predispoziţie mai mare de boală. Factorii de mediu vor determina uneori *când* şi *cât* de afectate vor fi persoanele cu predispoziţie genetică. Boala apare atunci când o persoană cu un număr important de gene de risc (depăşeşte deci pragul de risc), se expune unor condiţii defavorabile de mediu, care transformă predispoziţia genetică în boală.

Atingerea şi depăşirea pragului de risc depinde de numărul de gene de risc pe care o persoană le moşteneşte de la ambii părinţi. În consecinţă, în bolile multifactoriale cu predispoziţie genetică se observă următoarele **caracteristici**:

- boala are frecvent un *caracter familial*; cu cât afecţiunea este mai rară în populaţia generală, cu atât boala este mai frecventă printre rude (de exemplu, despicăturile labiale – cu o frecvenţă în populaţia generală de 2/1000 au o frecvenţă de 3% printre rudele de gradul I; despicăturile palatine –1/1000 – au o frecvenţă de 5% printre rudele de gradul I)
- indivizii afectaţi se găsesc *dincolo* de pragul distribuţiei în populaţie a susceptibilităţii determinate genetic, dar *poziţia lor exactă nu poate fi definită*; de aceea, pentru cele mai multe boli multifactoriale s-a stabilit un **risc empiric**, bazat pe analiza unui număr mare de familii în care apare un bolnav (în bolile mendeliene riscul este determinat de modelul specific de transmitere ereditară, AD sau AR sau LX).
- părinţii bolnavului pot fi sănătoşi sau unul dintre ei poate fi bolnav;
- un bolnav are un risc mai mare de a avea copii bolnavi comparativ cu persoanele din populaţia generală;
- rudele de gradul I ale bolnavului (fraţi, copii) au un risc mai mare de boală, comparativ cu populaţia generală; riscul scade însă odată cu scăderea gradului de rudenie (figura 5.43)
- riscul de îmbolnăvire *diferă de la o familie la alta*, funcţie de numărul de gene de risc (spre deosebire de transmiterea monogenică în care riscul este constant); în plus, el *poate fi diferit în populaţii diferite* datorită faptului că frecvenţele genelor implicate ca şi a factorilor de mediu sunt diferite. De exemplu, riscul empiric pentru defectele de tub neural în SUA este de 2-3%, în timp ce în populaţia britanică este de 5%.

Aceste caracteristici sunt utile pentru stabilirea naturii multifactoriale ale unor boli în care factori genetici multipli determină o predispoziţie la boală iar mediul este cel care transformă vulnerabilitatea în boală. În practică, *diagnosticul de ereditate multifactorială este un diagnostic de excludere*. Trăsăturile clinice ale unei boli multifactoriale nu se deosebesc de obicei de trăsături similare de altă cauză. De exemplu, DLP, singură sau asociată cu alte anomalii este, obişnuit, multifactorială. Dar sunt peste 200 de afecţiuni în care DLP este doar o manifestare în cadrul unui sindrom plurimalformativ specific. Multe din aceste condiţii sunt consecinţa unor anomalii cromosomiale, altele ale unor boli monogenice, iar altele ale unor factori de mediu teratogeni. Uneori este dificil de a distinge o boală poligenică de una monogenică cu penetranţă redusă sau expresivitate variabilă.

Deoarece factorii de risc sunt diferiţi pentru diferite boli multifactoriale, *riscul empiric de recurenţă* este şi el *specific* fiecărei boli în parte, fiind dependent şi de *frecvenţa bolii în populaţie*. Riscul de recurenţă pentru rudele de gradul I, adică fraţi-surori sau copii, este aproximativ egal cu rădăcina pătrată a incidenţei generale în populaţie. Astfel, pentru *malformaţiile congenitale izolate*, care au o incidenţă în populaţie de circa 1/1000, dacă doi părinţi sănătoşi, fără alte antecedente familiale, au un copil afectat, riscul de recurenţă la sarcinile următoare este de 1 la 32 sau 3%; acelaşi risc îl au şi descendenţii unui bolnav. Pentru bolile multifactoriale ale adultului, care au în populaţie o prevalenţă de circa 1/100, riscul de recurenţă în fratrie şi la copiii unui individ afectat este de 10%.

Riscul la descendenţi *creşte* (peste 5% în malformaţiile congenitale izolate) dacă:

- în familie sunt *mai multe persoane afectate* (în bolile monogenice riscul este constant); de exemplu, în cazul despicăturii labiale ± palatine (DLP) riscul de recurenţă după naşterea unui copil afectat este 4 % iar dacă sunt doi copii afectaţi riscul creşte peste10 %); prezenţa unui al doilea bolnav în familie nu modifică *per se* riscul genetic ci indică faptul că familia are o predispoziţie gentică mai mare şi deci un risc de recurenţă mai mare
- bolnavul prezintă *o formă mai gravă de boală*[46]; de exemplu, riscul de recurenţă în DLP unilaterală este de 2,5%, în cea bilaterală riscul este de 6%; Cu cât defectul este mai sever cu atât susceptibilitatea genetică este mai mare;
- dacă *unul din sexe este mai frecvent afectat* (ex. sexul masculin pentru stenoza congenitală de pilor sau sexul feminin pentru luxaţia de şold), riscul de recurenţă este mai mare după naşterea unui copil care aparţine sexului mai rar afectat, deoarece individul afectat, de sex mai puţin susceptibil, este obişnuit într-o poziţie extremă a distribuţiei de susceptibilitate. Astfel, în stenoza de pilor cu sex-ratio de 5M:1F, dacă tatăl a fost afectat, recurenţa este de 5,5% la băieţi şi de 2,4% la fete; dacă mama a fost afectată, riscul este de 19,4% pentru băieţi şi de 7,3% pentru fete.
- au loc *căsătorii consangvine* şi persoanele înrudite au un număr mai mare de gene în comun.

c). Ereditatea oligogenică sau modelul mixt

Chiar dacă modelul susceptibilităţii cu prag descris anterior este satisfăcător prin criteriile pe care le oferă, pentru unele boli multifactoriale pot fi şi alte explicaţii. Este posibil ca diferite gene implicate în boală să joace roluri de importanţă inegală. În unele cazuri, un caracter poate fi determinat de acţiunea combinată a unei /unor gene de susceptibilitate cu efect major şi a unui "fond" multifactorial în care genele adiţionale şi factorii de mediu au fiecare un mic efect adiţional.

Dacă luăm din nou ca exemplu talia, putem presupune că variaţia în înălţime este determinată de un singur locus (sau **genă majoră**) şi o componentă multifactorială. Indivizii cu genotipul ***AA*** vor tinde spre o talie înaltă, cei cu genotip ***aa*** spre o talie mică iar cei cu genotip ***Aa*** spre o talie intermediară. Astfel, cei cu genotip ***aa*** vor avea variaţii ale taliei între 130 cm şi 170 cm., cei cu genotip ***Aa*** vor avea variaţii ale taliei între 150 cm şi 190 cm. iar cei cu genotip ***AA*** vor avea variaţii ale taliei între 170 cm şi 210 cm. (figura 5.44).

O explicaţie utilă e oferită de dr. Michael Brown de la Universitatea din Texas care face o analogie cu ceea ce el numeşte "sindromul cucuiului". Dacă s-ar reduce imaginar tocul uşilor de la 200 cm. la 170 cm. am avea de a face cu aşa-zisul "sindrom al cucuiului". Boala ar surveni rar în familiile cu înălţime medie dar ar atinge proporţii epidemice la familiile înalte. Tocul uşii converteşte distribuţia continuă a înălţimii în aceste familii în două fenotipuri: cu cucui, cei peste 170 cm. (zona neagră din figura 5.38) şi fără cucui, cei sub 170

[46] Cu cât defectul este mai sever cu atât susceptibilitatea genetică este mai mare.

cm. (zona haşurată din figura 5.39). Deci chiar dacă nivelul prag rămâne acelaşi, numărul indivizilor cu cucui este proporţional mai mare decât cel aşteptat doar prin determinismul monogenic şi asta datorită faptului că lor li se adaugă cei cu predispoziţie genetică prin cumulul mai multor factori (genetici sau de mediu).

Din cauza influenţei „fondului" multifactorial, există o substanţială suprapunere ale celor trei genotipuri majore. Distribuţia globală a înălţimii, sub formă de clopot, este determinată de superpoziţia celor trei distribuţii ale fiecărui genotip.

Acest model în care factorii genetici sunt reprezentaţi de o componentă monogenică (o genă majoră, cu mai multe alele), o componentă poligenică şi factori de mediu, se numeşte **model mixt**. În acest caz distribuţia susceptibilităţii la boală este rezultanta mai multor distribuţii gaussiene corespunzând diferitelor genotipuri posibile (3 dacă sunt 2 alele) ale locusului major.

Teoria oligogenică ar reprezenta de fapt o piesă a spectrului complex al determinismului caracterelor umane, ilustrat în figura 5.45, care se plasează în diferite poziţii faţă de cei trei poli: monogenic, poligenic şi ecologic. Această teorie deschide o perspectivă optimistă pentru identificarea genelor de predispoziţie la boală

4.3. IDENTIFICAREA GENELOR IMPLICATE ÎN BOLILE MULTIFACTORIALE

Bolile multifactoriale – fie că este vorba de malformaţii congenitale sau de boli comune ale adultului – sunt frecvente şi au o contribuţie majoră la morbiditate şi mortalitate. Este deci firesc să se facă eforturi importante pentru a identifica genele care contribuie la etiologia lor, determinând susceptibilitatea la boală. In cazul caracterelor mendeliene, datorită corelaţiei puternice care există între genotip şi fenotip, studiile de înlănţuire permit de regulă cartografierea caracterului în interiorul unui interval minim de ordinul a 1cM. Ulterior sunt identificate variaţiile de secvenţă prezente la indivizii afectaţi în regiunile codante ale genelor candidat şi aceasta permite dovedirea corespunzătoare a identităţii genei implicate. Acest model de lucru nu se aplică însă în cazul caracterelor multifactoriale, în general pentru identificarea genelor implicate fiind necesare patru etape majore de lucru:

(1). Studiile de înlănţuire şi asociere.

Acestea au ca scop stabilirea unei asocieri semnificative a unei anumite regiuni genomice cu caracterul cantitativ respectiv. Cel mai adesea însă, chiar şi în cazul unor studii pe colecţii mari de familii, intervalul minim nu poate fi restrâns sub dimensiuni de 10-30cM, ceea ce corespunde la om unui fragment de 10-30Mb sau circa 100-300 gene.

- Studiile de asociaţie compară incidenţa unui anumit polimorfism la bolnavi cu incidenţa ei într-un grup control; dacă o alelă specifică a locusului polimorfic are o prezenţă semnificativ mai mare la indivizii cu boală comparativ cu cei neafectaţi atunci se poate presupune că alela respectivă este implicată în patogenia bolii. Astfel s-a putut stabili că alela epsilon 4 a genei apolipotpoteinei E poate fi un factor important de risc pentru boala Alzheimer.

Studiile de înlănţuire analizează cotransmisia în familii a unui locus marker şi a locusului boală. Aceasta ar aduce dovezi asupra implicării locusului respectiv (sau a altuia situat foarte aproape de el) în procesul de boală. Cel mai frecvent se foloseşte a*naliza de înlănţuire* a unei perechi de membri (frati) ai unei familii care sunt concordanţi pentru boală, deci au foarte probabil în comun anumite alele predispozante; se recurge la scanarea genomului (cu ajutorul a sute de markeri ADN polimorfici) pentru a găsi regiuni prezente la ambii membri mai frecvent decât s-ar aştepta; aceasta permite prezumţia ca în regiunea respectivă se află un locus implicat în boală.

(2). Cartografierea de fineţe.

Această etapă are ca scop reducerea la maximum posibil a dimensiunii intervalului critic şi se realizează prin studii familiale de dezechilibru a înlănţuirii (linkage disequilibrium – LD) sau prin studii caz-control. Asemenea studii permit reducerea intervalului critic la dimensiuni de ordinul a 1 cM.

(3). Analizele secvenţelor.

Analiza secvenţei ADN în intervalul minim este necesară pentru identificarea variantelor nucleotidice prezente. În ciuda eforturilor intervalul minim poate conţine frecvent câteva gene, fiecare cu numeroase variante nucleotidice, unele la nivelul regiunilor codante, iar altele în regiunile

care le flanchează. Se considera că adeseori caracterele multifactoriale pot fi determinate mai degrabă de variante ale unor secvenţe reglatorii decât de variante în secvenţele codante. Dacă în cazul regiunilor codante efectele pot fi uşor prevăzute prin simpla corelaţie cu codul genetic, consecinţele unor modificări în regiunile necodante sunt mult mai dificil de interpretat.

(4). Teste funcţionale ale variantelor nucleotidice candidate.

Aceasta etapă este complet diferită faţă de analizele utilizate pentru identificarea caracterelor mendeliene şi constă în dovedirea pe cale experimentală a efectului funcţional al variantelor candidat identificate. Aceasta presupune utilizarea unor modele animale sau culturi de celule umane şi se bazează pe tehnologia knock-in sau prin analiza efectului pe care îl are introducerea prin inginerie genetica a variantei nucleotidice testate. De multe ori este insa dificilă extrapolarea rezultatelor între specii diferite.

In ciuda dificultatilor menţionate au fost identificate câteva variante genice implicate în etiologia unor caractere multifactoriale la om. Mai jos sunt descrise câteva dintre cele mai sugestive exemple.

- Astfel, înlănţuirea genetică a **diabetului zaharat tip 1** cu genele complexului major de histocompatibilitate HLA-DR si HLA-DQ a fost stabilită de peste 20 de ani. Există mai multe categorii de dovezi care suportă ferm rolul *alelei DQ-beta* în susceptibilitatea la DZ tip 1: conservarea între specii a aminoacidului din poziţia 57; asocierea semnificativă între DQ-beta şi DZ tip 1 în diverse populaţii; faptul că aminoacidul 57 este structura cheie a moleculei DQ-beta.
  In **diabetul zaharat tip 2** un screening la nivelul întregului genom a permis identificarea unei regiuni de pe cromosomul 2 puternic înlanţuită cu boala. Regiunea a putut fi redusa din fericire la circa 1,7 Mb. În interiorul acestei regiuni au fost identificate multiple polimorfisme mononucleotidice (SNP), iar dintre acestea, haplotipul unei grupări de trei SNP de la nivelul genei pentru *calpacaina-10* (*CAPN10*) s-a dovedit a fi puternic asociat cu DZ tip 2 în mai multe populaţii.
- Alela E4 a *apolipoproteinei E* (*APOE4*) este asociată într-o manieră doză-dependenta cu susceptibilitatea la **boala Alzheimer**. Aceasta asociere, împreuna cu localizarea proteinei APOE4 la nivelul leziunilor cerebrale şi cu rolul proteinei ApoE (de la şoarece) în formarea depozitelor de amiloid susţin cu putere rolul APOE4 în susceptibilitatea la boala Alzheimer.
- Gena *CARD15* (care codifică proteina 15 cu domeniu de recrutare a caspazei) localizată la nivelul cromosomului 16 a fost identificată ca genă de susceptibilitate la **boala Crohn**. In interiorul acestei gene au fost identificate câteva variante frameshift şi cu sens gresit care sunt puternic asociate cu boala, deşi confirmarea efectului lor prin studii knock-in la soareci încă lipseşte.
- Alte gene implicate în etiologia unor caractere multifactoriale pentru care există dovezi puternice sunt ADAM33 (cromosomul 20, codifică o proteina din familia dezintegrinelor si metaloproteazelor) în **astmul bronşic** sau ACE1 (cromosomul 17, codifica enzima de conversie a angiotensinei 1) in susceptibilitatea la **hipertensiunea arteriala esentiala**.

INTERNET

1. Dicţionar de biologie celulară: http://www.mlab.gla.ac.uk/~julian/Dict.html
2. Genetică medicală - University of Utah School of Medicine: http://medgen.genetics.utah.edu
3. Genetică medicală - http://www.hslib.washington.edu-helix
4. Gene amprentate; http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting
5. Principii de genetică -Indiana U niversity Biotechnology: http://biotech.chem.indiana.edu
6. National Human Genome Research Institut: http://www.nhgri. nih.gov.
7. Nomenclatura genelor: http://www.gene.ucl.ac.uk/cgi-bin/nomenclature/searchgenes.pl
8. NORD: asociaţia naţională pentru boli rare: http://www.NORD-rdb.com/~orphan
9. OMIM: http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim

Bibliografie specifică selectivă

1. Badano, J.L, Katsanis, N. - *Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission* - Nat. Rev. Genet. 2002;3:779-789.
2. Barlow D.P. - *Gametic imprinting in mammals* - Science 1995;270:1610-1613
3. Barsh GS. – *The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits* – Trends Genet., 1996;12:299 -305
4. Bernards A., Gusella JF. – *The importance of genetic moyaicism in human disease* – N.Engl.J.Med.,1994; 331:1447-1449

5. Dynalcht BD – *Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle* – Nature,1997;389:149-152
6. Gao CY, Zelenka PD. – *Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation* - BioEssay, 1997;19:307-315.
7. Glazier, A.M., Nadeau, J.H., Altman T.J. - *Finding genes that underlie complex traits* - Science, 2002;298:2345-2349.
8. Ghosh S., Collins FS. – *The geneticist's approach to complex disease* – Ann.Rev.Med. 1996;47:333-353
9. Hall JG. – *Twins and twinning* – Am.J.Med.Genet., 1996;61:202-204.
10. Hall JG. – *Genomic imprinting: nature and clinical relevance* – Ann.Rev.Med., 1997; 48:35-44.
11. Hawkes CH. – *Twin studies in medicine-what do they tell us?* – QJ Med. 1997;90:311-321.
12. Hickey RJ; Malkas LH - *Mammalian cell DNA replication* – Crit. Rev.Eukar. Gene Expres. 1997;7:125-157
13. Lander E., Kruglyak L. – *Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results* – Nat.Genet., 1995;11:241-247
14. Latham KE. – *X chromosome imprinting and inactivation in the early mammalian embryo* - Trends Genet. 1996;12:134-138
15. Lee JT, Jaenisch R – *The (epi)genetic control of mammalian X-chromosome inactivation* - Curr.Opin.Genet.Dev., 1997;7:274-280.
16. Matin, A., Nadeau, J.H. - *Sensitized polygenic trait analysis* - Trends Genet. 2001;17: 727-731.
17. Nadeau J.H. (2001) - *Modifier genes in mice and humans* - Nat. Rev. Genetics, 2: 165-174.
18. Reddy PS, Houssman DE. - *The complex pathology of trinucleotid repeats* – Curr.Opin.Genet.Dev., 1997;9:365-372.
19. Roeder G.S. – *Meiotic chromosomes: it takes two to tango* – Genes & Development, 1997, 11:2600-2621
20. Romeo G., McKusick V.A. – *Phenotypic diversity, alelic series and modifier genes* – Nature Genet 1994;7:451-453
21. Risch N, Merikangas K. – *The future of genetic studies of complex human diseases* – Science 1996;273:1526-1517
22. Tjian R. – *Molecular machines that control genes* - Sci.Amer. 1995; 272:54-61.
23. Zlotogora J. –*Germ line mosaicism* – Hum.Genet., 1998;102:381-386.
24. Wilkie AOM. – *The molecular basis of dominance* – J.Med.Genet., 1994;31:89-98
25. Warburton D. – *Human female meiosis: new insight into an error-prone process* – Am.J.Huma.Genet. 1997; 61:1-4

CAPITOLUL 6

VARIABILITATEA GENETICĂ

Genetica este ştiinţa eredităţii şi a variabilităţii. Dacă ereditatea determină *conservarea* informaţiei genetice şi deci a similitudinii biologice dintre părinţi şi copii, variabilitatea creează deosebirile dintre generaţii. Dar diferenţele fenotipice dintre indivizi pot fi produse fie de modificări ale materialului genetic, fie de factori din mediul înconjurător. Prin **variabilitate genetică** se înţelege ansamblul de fenomene care produc *diferenţele genetice* între indivizii unei populaţii precum şi între populaţii diferite. Datorită acestor diferenţe se creează diversitatea, premisă esenţială a evoluţiei.

Consecinţele fenotipice ale diferenţelor ce pot apărea în secvenţa ADN la diferiţi indivizi au un spectru larg: unele nu au efect fenotipic sau acesta este minim, altele pot produce direct o stare de boală; între aceste două extreme se plasează *variaţile fenotipice normale* determinate genetic ale morfologiei şi fiziologiei organismului, ale comportamentului şi personalităţii individului, ale răspunsului său la factorii externi (de la alimente, la agenţi cauzatori de boală sau medicamente). Deci bolile genetice sunt numai partea cea mai evidentă, extremă, a variabilităţii genetice.

A. SURSELE DE VARIABILITATE

Variabilitatea genetică este produsă prin mutaţii, recombinări şi migraţii. Aceste trei fenomene sunt interconectate: mutaţiile determină modificări în structura materialului genetic al unui individ şi creează fondul genetic caracteristic unei populaţii; migraţiile unor persoane dintr-o populaţie în altă populaţie aduc un potenţial genic nou iar recombinările din gametogeneză şi fecundare produc un „amestec" al zestrei genetice parentale într-o combinaţie nouă, specifică descendentului. Cert este că genomul uman nu este o entitate statică, fixă.

1. MUTAŢIILE

Termenul de mutaţie a fost folosit pentru prima oară în genetică de către Hugo de Vries, în 1901. Prin **mutaţie** se înţelege orice modificare în secvenţa sau aranjarea nucleotidelor din ADN. Aceste modificări sunt nenaturale (accidentale), permanente şi ereditare. Dacă interesează ADN genic, ele pot produce o schimbare detectabilă a fenotipului (dar acest lucru nu este obligatoriu). Celula sau organismul ce prezintă o astfel de modificare se numeşte *mutant*.

În funcţie de *mărimea* materialului genetic interesat – genă, cromosom, genom - mutaţiile se pot clasifica în trei mari categorii:

(1) *Mutaţii genice,* care afectează secvenţa nucleotidelor unei gene; ele pot interesa întreaga genă sau o parte a ei (rearanjări intragenice) sau numai o pereche sau câteva perechi de nucleotide (mutaţii punctiforme), formând o variantă alelică a genei normale („de tip sălbatic"); frecvenţa mutaţiilor genice este apreciată la 10^{-5} – 10^{-6} /locus/generaţie.

(2) *Mutaţii cromosomice,* care produc schimbări în structura cromosomilor şi deci în ordinea liniară a genelor în cromosomi (remanieri cromosomice: pierderea, câştigul sau

rearanjarea unor segmente); mutaţiile cromosomice se produc cu o frecvenţă de 10^{-4} /diviziune celulară.

(3) *Mutaţii genomice („de ploidie”)*, care afectează cantitatea de material genetic şi se traduc printr-o modificare a numărului diploid de cromosomi întregi; ele afectează fie 1-2 perechi de cromosomi (aneuploidie), fie toţi cromosomii, prin adăugarea a 1-2 seturi haploide (poliploidie). Mutaţiile genomice sunt cele mai frecvente mutaţii la om, 10^{-2} /diviziune celulară.

Ultimele două tipuri de mutaţii sunt reunite într-un singur grup numit *anomalii cromosomice*.

O altă clasificare a mutaţiilor se bazează pe tipul de celule afectate: *germinale* (ce vor forma, în gonade, celule sexuale) sau *somatice*. În cazul, **mutaţiilor germinale**, se pot produce gameţi anormali care (în cazul în care individul este fertil), după fecundare, *transmit* mutaţia la generaţia următoare, rezultând un individ ale cărui celule vor fi toate mutante; mutaţiile germinale sunt deci ereditare. În al doilea caz, cel al **mutaţiilor somatice,** descendenţii unei celule mutante vor forma o clonă celulară anormală, prezentă în anumite ţesuturi, rezultând un *mozaicism somatic*; mutaţiile somatice nu pot fi transmise generaţiilor viitoare.

În funcţie de cauză, mutaţiile pot fi clasificate în spontane şi induse. **Mutaţiile spontane** sunt cele mai numeroase şi se produc prin erori de copiere în cursul replicării ADN. Deşi funcţia de autocorecţie a ADN polimerazelor reduce semnificativ numărul de erori, mărimea enormă a genomului uman face ca la orice replicare a celor 3 miliarde de nucleotide să apară erori (10^{-10}). **Mutaţiile induse** sunt determinate de agresiunea unor substanţe chimice exogene, a radiaţiilor ionizante sau a metaboliţilor reactivi. Urmările acestor atacuri genotoxice sunt reduse prin intervenţia unor sisteme eficace de supraveghere, alarmă şi reparare; dovada nedorită a eficacităţii lor este adusă de mutaţiile genelor implicate în aceste procese ce cresc semnificativ rata mutaţiilor, producând - cel mai - adesea cancere.

Consecinţele fenotipice ale mutaţiilor formează un spectru foarte larg.

- Cele mai multe mutaţii germinale (produse în regiunile necodante ale ADN) nu au un efect fenotipic, sunt *mutaţii neutre*. Ele generează variantele alelice ce alcătuiesc *polimorfismul ADN*, dacă un locus are mai mult de o variantă (alelă) ce se întâlneşte în populaţie cu o frecvenţă mai mare de 1% (ce face ca producerea ei întâmplătoare să fie improbabilă). *Heterozigoţia medie* a ADN genomic la om a fost apreciată la 0,001 – 0,004 (adică 1:250 – 1:1000 pb diferă prin secvenţele alelice). De notat că unele gene, şi în special genele HLA, au un polimorfism înalt.
- Uneori mutaţiile noi pot avea *efecte benefice*, producând o mai bună adaptare la mediu şi/sau o rezistenţă mai mare la agresiunile ecologice sau o creştere a „aptitudinilor reproductive” („fitness”). Avantajul selectiv al heterozigoţilor (Na), purtători ai unei gene mutante, se poate înscrie în această categorie (vezi capitolul 7). Cert este că mutaţiile reprezintă *„combustibilul brut care conduce evoluţia”*.
- Deseori mutatiile pot fi *patogene*, producând o modificare fenotipică evidentă (letală, subletală, morbidă) sau crescând susceptibilitatea la boală.

Până acum ne-am referit la mutaţiile germinale, care sunt ereditare. Deşi *mutaţiile somatice* nu se transmit la descendenţi, nu înseamnă că medical nu sunt importante. Evoluţia de la zigot la adult necesită circa 10^{15} diviziuni celulare; la o frecvenţă medie de 10^{-10} erori de replicare per diviziune se produc în genomul fiecărei celule somatice mii de mutaţii. Efectul lor va depinde de natura mutaţiei, localizarea şi ţesutul implicat; ele vor produce clonele anormale implicate în cancer, afectări degenerative sau „îmbătrânire” precoce.

Consecinţele patogene ale mutatiilor, germinale şi somatice, ne permit să afirmăm că *mutaţiile sunt cauza principală de boală la om.*

2. RECOMBINĂRILE GENETICE

Prin reombinare genetică înţelegem producerea unor *combinaţii genetice noi*

(recombinanţi), prin rearanjarea (reasortarea, redistribuţia) materialului genetic cuprins în două unităţi genetice diferite.

Recombinarea genetică este un proces natural şi reprezintă *„una din cheile mecanismelor prin care se formează noi indivizi ce vor fi apoi testaţi, prin selecţie naturală, în marea schemă a evoluţiei biologice”* (Wetzel, 1980).

Procesul de recombinare necesită o asociere intimă şi apoi o interacţiune între două unităţi genetice diferite; această „condiţie” permite, între altele, diferenţierea dintre recombinările genetice şi mutaţii. În funcţie de mărimea unităţilor implicate în replicare – genom, cromosom, genă – se pot deosebi mai multe tipuri de recombinare.

2.1 RECOMBINAREA GENOMICĂ.

Recombinarea genomică se realizează în cadrul procesului sexual, prin asortarea genomurilor din gameţii care unesc, pentru a forma zigotul. Reproducerea sexuată asigură nu numai continuitatea şi păstrarea genelor şi caracterelor de la părinţi la copii, dar şi creşterea variabilităţii urmaşilor. Când se unesc doi gameţi proveniţi de la indivizi neînrudiţi, diferiţi genetic, descendenţii vor prezenta o vitalitate sporită, calităţi noi, o adaptabilitate mai bună şi o fertilitate crescută. Această vigoare hibridă sau **heterozis** este consecinţa heterozigotismului care se creează la descendenţi. În cazul încrucişării între indivizi apropiaţi sau înrudiţi (consanguinitate), gradul de heterogenitate se reduce şi creşte fenomenul de omogenizare genetică (vezi capitolul 5.D.3). Deci recombinarea genomică este o importantă sursă de varibilitate, cu condiţia ca genomurile care se combină să fie cât mai diferite.

2.2 RECOMBINAREA CROMOSOMICĂ

Recombinarea cromosomică se produce în cursul gametogenezei între cromosomii omologi (cu origine diferită) prin fenomenele specifice meiozei I (vezi capitolul 5.C.1.c). Ea poate avea loc între cromosomi „întregi” (recombinare intercromosomică) sau între „părţi” din cromosomi (recombinare intracromosomică).

a. Recombinarea intercromosomică

Recombinarea intercromosomică se produce în cursul anafazei I, atunci când cromosomii ce formează o pereche de omologi se separă şi apoi se dirijează spre celulele fiice independent de alte perechi de omologi. Prin această *asortare independentă* se formează 2^{23} tipuri de gameţi, deci peste 8,4 milioane de gameţi diferiţi, la fiecare din cele două sexe. (această cifră este valabilă pentru situaţia în care cromosomii se deosebesc printr-o singură genă). După fecundare pot rezulta teoretic 2^{46} combinaţii, valoare ce depăşeşte de opt mii de ori populaţia actuală a globului pământesc. Să nu uităm însă că fiecare cromosom are mai multe gene; de aceea se poate afirma că fiecare persoană are o structură genetică unică şi nerepetabilă. Asortarea independentă a cromosomilor omologi explică a doua lege a lui Mendel, referitoare la *combinarea liberă a "factorilor ereditari"* (genelor) şi distribuţia diferită a unor caractere, normale sau anormale, la descendenţi (vezi capitolul 5.D.1).

b. Recombinarea intracromosomică (“omologă”)

Variaţiile genotipice individuale produse prin recombinarea intercromosomică sunt amplificate prin *schimbul reciproc şi egal de gene* dintre cromosomii omologi care se produce prin crossing-over, în profaza I (vezi capitolele 3.A.2; 5.C.1 şi caseta 6.1). Prin această recombinare intracromosomică sau omologă cromosomii omologi, care iniţial erau diferiţi ca origine, suferă o recombinare a genelor parentale.

2.3 RECOMBINAREA INTRAGENICĂ

Recombinarea intragenică se produce printr-un crossing-over egal între două gene alele şi produce o **genă** hibridă sau o **fuziune genică,** ce conţine un fragment terminal dintr-o alelă şi restul de secvenţă din cealaltă alelă (figura 6.1). Recombinarea intragenică poate produce şi fenomenul de *conversie genică,* la care ne vom referi ulterior.

CASETA 6.1

Mecanismul recombinării intracromosomice

Procesul de recombinarea intracromosomică, o sursă majoră de diversitate genetică, are loc printr-un mecanism molecular care este doar parţial înţeles, dar asemănător cu cel al recombinării omologe responsabile de repararea rupturilor ADN bicatenare (vezi figura 6.23).

Înainte de iniţierea procesului de crossing-over este necesară împerecherea cromosomilor omologi. Acest mecanism, care aduce în imediata vecinatate secvenţele ADN ce vor fi schimbate în cadrul crossing-over, pare a fi reglat independent de recombinarea propriu-zisă. Procesul de recombinarea este iniţiat prin producerea în profaza meiozei a unor rupturi ADN bicatenare în câteva puncte de-a lungul fiecaruia din cele patru cromatide de către endonucleaza SPO11, proteina înrudită cu topoizomerazele II. SPO11 formează o legătura fosfodiester între un aminoacid tirozina şi nucleotidul din poziţia 5' de la nivelul punctului de ruptură. Aceste puncte de ruptură par a nu apare întâmplător de-a lungul cromosomilor ci mai frecvent în regiunile promotor ale genelor şi preferential în regiunile cromosomice bogate în perechi de baze GC. Consecinţele defectelor SPO11 au fost evidenţiate pe modele animale şi constau în alterarea formării chiasmatelor şi aneuplodie masivă cu imposibiliatea formării unor gameţi funcţionali.

Ulterior are loc îndepărtarea SPO11 şi procesarea capetelor rupte sub acţiunea 5' – 3' exonucleazică a unui complex proteic format cel puţin din proteinele RAD50 si MRE11. Aceasta conduce la formarea unor capate protruzive 3', monocatenare, situate de fiecare parte a unei rupturi. Unul dintre aceste capete protruzive 3' va invada apoi o cromatida a cromosomului omolog şi acelaşi proces va fi realizat de către capatul protruziv 3' opus pentru cealaltă cromatidă a cromosomului omolog. Aceste proces este controlat de către proteinele DMC1 si RAD51. Urmează un proces de reparare a dublei joncţiuni tip Holliday formate cu participarea unor ADN polimeraze si ADN ligaze.

Etapa finală a acestui proces este rezoluţia joncţiunilor Holliday care este esenţială pentru separarea cromosomilor patern şi matern şi evidenţierea recombinanţilor. Aceasta etapă presupune intervenţia unor rezolvaze încă neidentificate.

3. MIGRAŢIILE

Prin migraţii se înţelege *transferul de gene* prin deplasarea unui grup de indivizi dintr-o populaţie în altă populaţie genetic diferită. Prin imigrare se produce astfel o introducere a unor gene noi în populaţia gazdă. Asupra acestui mecanism ne vom referi pe larg în capitolul următor, Genetica populaţiilor, dar vom preciza aici că migraţiile au reprezentat şi în specia umană o sursă importantă de variaţii ereditare.

B. MUTAŢIILE GENICE

Mutaţiile sunt definite ca modificări permanente şi ereditare în secvenţa nucleotidelor sau aranjarea ADN. Prin aceste modificări se produc *variante alelice* ale secvenţei de ADN (genă sau secvenţă extragenică). Unele dintre aceste variante nu au efect fenotipic sau acesta este mi nim; alte variante alelice, produse prin mutaţie, pot fi implicate direct în etiologia unor boli.

Introducerea metodelor de analiză a ADN a permis, în ultimii 20 de ani, realizarea unor progrese remarcabile în identificarea şi studiul mutaţiilor răspunzătoare de producerea unor boli monogenice. S-a putut defini astfel *spectrul mutaţiilor* pentru aceste boli, atât calitativ (tipurile şi poziţiile mutaţiilor, precum şi efectul lor asupra funcţiei genei) cât şi cantitativ (analiza frecvenţei mutaţiilor în diferite populaţii sau *epidemiologia moleculară*). Consecinţele au fost multiple şi pot fi grupate în trei categorii:

- Cunoaşterea teoretică mai precisă a diversităţii mecanismelor mutaţionale ce operează la om şi descoperirea unor mecanisme noi (transpoziţii, inversii, expansiuni de repetiţii trinucleotidice);

- Înţelegerea mai precisă a mecanismelor patogenice ale unor boli (pierderea totală sau parţială a funcţiei proteinelor, modificarea sau achiziţia unor proprietăţi noi ale proteinelor codificate de genele mutante);
- Ameliorarea calităţii şi eficienţei diagnosticului în numeroase boli monogenice, precum şi a sfatului genetic şi diagnosticului prenatal.

1. TIPURI ŞI MECANISME DE PRODUCERE ALE MUTAŢIILOR GENICE

Mutaţiile care afectează regiuni mici din genom pot fi împărţite în două mari clase:

- modificări ale unei *secvenţe unice* de ADN sau **mutaţii simple**; acestea sunt de obicei *microleziuni*, interesând unul sau câteva nucleotide;
- modificări ce implică *schimburi* între două secvenţe alelice/nealelice de ADN sau **recombinări genice aberante**; ele generează macroleziuni (mari deleţii, inserţii, duplicaţii, inversii mari, fuziuni de gene) interesând o parte din genă sau chiar întreaga genă

În funcţie de modificarea produsă în secvenţa de nucleotide a ADN se pot deosebi trei mari categorii de mutaţii (figura 6.2):

- **substituţii nucleotidice** – ce implică de regulă *înlocuirea* unei singure perechi de baze; mai rar pot fi înlocuite simultan mai multe nucleotide grupate, rezultând o formă de conversie genică;
- **deleţii** – eliminarea (pierderea) unuia sau mai multor nucleotide din secvenţa genei, mai rar părţi din genă (exoni) sau întreaga genă;
- **inserţii** – introducerea (adiţia) unuia sau mai multor nucleotide în structura genei; rar se pot produce inserţii largi (prin transpoziţie), amplificarea (expansiunea) unor secvenţe repetitive trinucleotidice sau duplicaţia genei.

Majoritatea mutaţiilor sunt modificări *stabile/fixe* ale secvenţei ADN. Recent s-a descris o clasă nouă de mutaţii numită *mutaţii instabile sau dinamice* în care anumite repetiţii trinucleotidice suferă modificări (de obicei expansiuni) atunci când sunt transmise în succesiunea generaţiilor.

În funcţie de tipul secvenţelor din structura genei care sunt afectate, mutaţiile pot interesa *secvenţele codante* (exonii) sau *necodante* (intronii, secvenţele reglatoare), cu efecte variate asupra expresiei informaţiei ereditare şi implicit asupra sintezei de proteine (alterarea structurii sau cantităţii).

Descrierea diferitelor tipuri de mutaţii se bazează pe o nomenclatură specifică, stabilită de grupuri de experţi, prezentată în caseta 6.2..

CASETA 6.2

Nomenclatura mutaţiilor

Nomenclatura mutaţiilor a fost stabilită de către Genome Database Nomenclature Commitee şi poate fi accesată la adresa http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/ Mutaţiile pot fi descrise în două modalităţi: prin efectul lor sau prin descrierea secvenţei modificării.

Nomenclatura pe baza efectului alelei mutante este folosită mai ales la organismele de laborator. O alelă nulă sau amorfă nu produce nici-un efect; o alelă hipomorfă produce o cantitate sau o activitate redusă a produsului genei; o alelă hipermorfă determină o cantitate sau activitate crescută de produs; o alelă neomorfă este o alelă cu activitate sau produs nou; o alelă antimorfă este o alelă a cărei activitate sau produs antagonizează activitatea produsului normal.

Nomenclatura pentru descrierea mutaţiei este amplă (vezi Antonarakis et al.,1998). Vom prezenta aici câteva repere.

Substituţiile de amino acizi. *Reziduurile de aminoacizi (desemnaţi prin codul de trei litere sau cel cu o singură literă[1]; vezi tabelul 4.2) sunt numărate începând cu metionina (corespunzătoare codonului iniţiator) considerată numărul 1. Astfel mutaţia cu sens greşit în codonul 6 al genei pentru β-globină şi substituţia acidului glutamic cu valina ce produce sicklemia se scrie: Glu6Val sau E6V. O mutaţie non sens ce înlocuieşte glutamina din poziţia 39 a β-globinei cu un „codon stop", producând o formă trunchiată a β-globinei şi determinând β^o-talasemia, se scrie Gln39X sau Q39X*

Substituţiile nucleotidice*. În descriere se va scrie mai întâi baza originală, numărul nucleotidului cu această bază, simbolul mai mare (>) şi apoi noul nucleotid din poziia respectivă. Numărul nucleotidului se calculează de la primul nucleotid A din codonul iniţiator (start) ATG care este +1 (nucleotidul precedent este -1; nu există nucleotid 0). Dacă este necesar se va folosi* ***g.*** *şi* ***c.*** *pentru a indica o secvenţă de ADN genomic sau ADN complementar.*

De exemplu, o mutaţie cu sens greşit se poate scrie G1444>A (uneori se mai scrie 1444G>A)

Pentru modificări în introni, se va specifica numărul intronului (desemnat cu iniţialele IVS de la „intervening sequence"), numărul nucleotidului (+1, +2) începând cu situl donor 5' sau invers (-1, -2) de la situsul 3'acceptor. D ex., IVS33+2T>A reprezintă o mutaţie în intronul 33 în situsul donor, ăn care T este înlocuită cu A.

Deleţiile şi inserţiile*. Deleţiile mici sunt indicate prin termenul „del" scris după numerele nucleotidelor deletate; de ex., 1524-1527del sau 1524-1527delAGTA – deleţia a 4 nucleotide (AGTA). Pentru a preciza modificarea aminoacizilor atunci se scrie mai întâi simbolul lor. De ex., F508del semnifică deleţia fenilalaninei în poziţia 508 (această modificare frecventă în mucoviscidoză s-a scris iniţial ΔF508, semnul delta semnificînd deleţie). Inserţiile mici sunt desemnate similar cu termenul „ins" după cele două nucleotide între care se produce inserţia, urmat de nucleotidele inserate. De ex., 1277-1278insTATC denotă inserţia a patru baze între nucleotidele 1277 şi 1278, o cauză comună a bolii Tay-Sachs*

1.1 SUBSTITUŢIA UNUI NUCLEOTID

Înlocuirea unui singur nucleotid (şi deci a unei perechi de baze în ADN bicatenar) este o **mutaţie punctiformă** şi reprezintă cel mai frecvent tip de mutaţie întâlnită la om. Astfel, din circa 130 de variante anormale ale hemoglobinei umane, 120 sunt produse prin substituţii.

a). Tranziţii şi transversii.

Se deosebesc două tipuri de substituţii: **tranziţiile** care reprezintă înlocuirea unei baze pirimidinice (T sau C) sau purinice (A sau G) cu o bază de acelaşi tip şi **transversiile** în care o bază pirimidinică (T sau C) este înlocuită de o bază purinică (A sau G) şi *vice versa*. Teoretic, presupunând că substituţia se face la întâmplare, transversiile ar trebui să fie de două ori mai frecvente decât tranziţiile, deoarece orice bază poate suferi două transversii dar numai o singură tranziţie (figura 6.3) . În realitate, tranziţiile sunt mai frecvente ca transversiile; excesul de tranziţii este determinat probabil de acţiunea combinată a ADN polimerazei (ce poate încorpora eronat în procesul de replicare mai frecvent o bază *de acelaşi tip*) şi acţiunii sistemelor de corecţie (care recunosc mai uşor o încorporare de tipul transversiei, ce antrenează o modificare mai importantă a diametrului moleculei de ADN, decât tranziţia).

Printre tranziţii, cele ce interesează dinucleotidul CpG (sau 5'-CG-3') sunt mai frecvente decât celelalte dinucleotide (TpG sau CpA), reprezentând cam o treime din toate substituţiile. Acest dinucleotid CpG se găseşte mai ales în regiunile reglatoare ale transcripţiei (promotor), sub forma unor **insule CpG,** iar C situată în poziţia 5' faţă de G este frecvent metilată. În plus, citozina suferă deseori o dezaminare spontană transformându-se în uracil, un component anormal al ADN care este uşor recunoscut şi îndepărtat prin mecanismele de corecţie. Dacă dezaminarea interesează metil-citozina, aceasta este transformată în timină, o bază normală din structura ADN; în acest caz eroarea nu va fi uşor de recunoscut şi corectat,

[1] Codul cu o literă: A-alanina, C-cisteina, D-acidul aspartic, E.acidul glutamic, F-fenilalanina, G-lizina, H-histidina, I-isoleucina, K-lizina, M-metionina, N-asparagina, P-prolina, Q-glutamina, R-arginina, S-serina, T-treonina, V-valina, W-triptofanul, Y-tirozina; **X**-semnifică un codon stop.

producând o tranziţie C→T sau G→A în funcţie de catena ADN implicată (figura 6.4). Dinucleotidul CpG constituie deci *„un punct fierbinte”* de producere a mutaţiilor în genomul uman; într-adevăr tranziţiile în acest dinucleotid au fost găsite, în diferite boli, de 10-20 ori mai frecvent comparativ cu alte dinucleotide[2] şi circa 30% din toate substituţiile unui singur nucleotid sunt de acest tip.

b). Efectele substituţiei asupra informaţiei genetice.

Efectele substituţiei unui nucleotid depind de localizarea intragenică a mutaţiei: secvenţe codante, secvenţe intragenice necodante şi secvenţe reglatoare (vezi capitolul 3.B.1).

În regiunile codante (exoni) substituţia se poate face într-un codon sens sau nonsens şi modifică codonul respectiv, putând să-i schimbe semnificaţia (figura 6.5).

(1) Substituţia într-un *codon sens* poate produce:

- Un *codon sens sinonim*, care semnifică acelaşi aminoacid; mutaţia este fără efect asupra polipeptidului codificat de genă (care va rămâne nemodificat), este neutră din punct de vedere fenotipic şi evolutiv, şi se numeşte **mutaţie silenţioasă** (mută) sau **mutaţie sinonimă**;
- Un *alt codon sens* care semnifică un aminoacid *diferit*; acest tip de mutaţii *nesinonime*, care alterează „sensul” unui codon, se numesc **mutaţii cu sens greşit** (*„missens”*). Ele se împart în două grupe:
  - substituţii *conservative,* când este înlocuit un aminoacid cu altul care este chimic şi funcţional *similar,* (face parte din aceeaşi grupă; de ex., lizina şi arginina sunt aminoacizi bazici); adesea, efectul acestei substituţii asupra funcţiei proteinei este minim (ambii aminoacizi au funcţii similare);
  - substituţii *neconservative,* când este înlocuit un aminoacid cu altul care este chimic şi funcţional *diferit*; acest tip de mutaţii este frecvent (50%) în patologia genetică la om.
- Un *codon nonsens sau stop prematur*, care nu semnifică nici-un aminoacid; se formează un ARNm mai scurt şi, dacă acesta este stabil, o proteină „trunchiată” (de obicei instabilă şi degradabilă[3]); mutaţiile nonsens constituie aproximativ 12% din toate mutaţiile ce produc boli la om.

(2) Substituţia într-un codon *nonsens* poate produce:

- Un codon sens care semnifică un aminoacid; deci codonul stop este anulat, transcripţia continuă până la următorul codon stop şi se formează un ARNm mai lung, care va codifica o proteină anormal de lungă.
- Rareori rezultă *un alt codon stop* (UAA→UAG) şi mutaţia este fără efect asupra proteinei.

c). Consecinţele substituţiei în raport cu localizarea intragenică

Efectele substituţiei unui nucleotid depind de localizarea intragenică a mutaţiei: secvenţe codante, secvenţe intragenice necodante şi secvenţe reglatoare (figura 6.6).

(1) *Secvenţele codante* sunt afectate în marea majoritate a mutaţiilor patogene. Predomină substituţiile nucleotidice *nesinonime*, în special mutaţiile cu sens greşit, care modifică:

- stabilitatea proteinei, localizarea intracelulară, maturarea proteinei, asamblarea ei în structuri multimerice,
- interacţiunile cu liganzii sau alte proteine,
- situsul funcţional pentru activitatea enzimatică etc).

Totuşi, foarte rar, o substituţie sinonimă (de obicei neutră) poate cauza un efect patogen prin *activarea unui situs criptic de decupare/matisare* (asemănător celor din introni) care va determina excluderea unei părţi a exonului din ARNm. Remarcăm, de asemenea, că unii exoni pot avea în zonele cu dinucleotide CpG o rată mare de mutaţii.

(2) *Secvenţele necodante intragenice,* şi în special intronii, pot fi sediul unor mutaţii (în circa 10-15% din mutaţiile patogenice). Astfel, alterarea (prin substituţie) a situsurilor de decupare a intronilor (în engleză - *splice site mutations*) – situsul donor (5’-GT) sau acceptor (AG-3’) –

[2] În unele boli, din motive neclare, această probabilitate creşte considerabil; de ex. în acondroplazie mutaţia CpG din gena pentru FGFR3 este de cel puţin 100 de ori mai frecventă decât cea interesând alte dinucleotide.

[3] Efectul depinde de poziţia codonului stop, la începutul genei mai grav decât în regiunea terminală a genei.

face ca excizia să se producă la următorul exon şi, ca atare, în ARNm matur se va încorpora o parte sau întregul intron sau va lipsi un exon (în engleză - *exon skipping*), în funcţie de situsul afectat. Ambele situaţii au consecinţe importante asupra expresiei genei (ARNm instabil; polipeptid nefuncţional). Ocazional au fost descrise mutaţii patogenice şi în secvenţele 5'UTR (hemofilia B Leyden) sau 3'UTR, transcrise dar netranslate, din primul şi ultimul exon; ele pot modifica rata sintezei proteice.

(3) *Secvenţele reglatoare* pot suferi mutaţii care, evident, modifică rata transcripţiei (dacă afectează elementele promotorului şi interacţiunea lor cu factorii de transcripţie) sau stabilitatea moleculei de ARNm formate (când afectează situsul de poliadenilare din regiunea 3') şi deci cantitatea de proteină sintetizată; astfel de mutaţii se întâlnesc în talasemii.

d). Mecanismele posibile de producere a substituţiilor

Substituţiile nucleotidice pot fi produse fie spontan, prin erori în procesul normal de replicare a ADN, fie prin leziuni provocate în ADN de factori mutageni (chimici sau fizici).

- *Erorile de replicare* ale ADN apar prin împerecherea greşită a nucleotidelor (vezi 5.A.3.6). Ele sunt îndepărtate rapid prin procesul de corecţie fie de către ADN polimeraza δ, fie prin alte mecanisme de reparare; în final, rămîn puţine erori de replicare, aproximativ o mutaţie nouă la fiecare diviziune celulară.
- Mutaţiile pot apărea şi prin procese chimice spontane de *depurinare, dezaminare, demetilare* sau după expunerea la mutageni chimici sau fizici (radiaţii ionizante sau ultraviolete).

1.2 DELEŢII ŞI INSERŢII MICI

Un al doilea tip major de mutaţii este reprezentat de către deleţiile sau inserţiile a unul sau mai multe nucleotide; ele reprezintă circa un sfert din toate mutaţiile responsabile de producerea bolilor genetice la om.

- Dacă deleţiile sau inserţiile sunt un multiplu de trei nucleotide se produce lipsa sau adiţia unor aminoacizi în proteină. Un exemplu interesant este cel al mutaţiei ΔF508 (sau F508 del, după nomenclatura actuală), ce produce aproape 70% din cazurile de fibroză chistică la Europeni; prin deleţia a trei perechi de nucleotide din gena CF rezultă pierderea fenilalaninei (F) din poziţia 508 a proteinei CFTR (vezi capitolul 11.B.4).
- Atunci când numărul nucleotidelor deletate sau inserate nu este un multiplu de trei se produce o *decalare (defazare) a cadrului de lectură al genei*, de la locul în care s-a produs deleţia sau inserţia (figura 6.7); să ne reamintim că citirea informaţiei genetice se face continuu, în grupe de trei nucleotide sau codoni adiacenţi, formaţi prin simpla grupare câte trei (vezi 4.B.3.a). Acest tip de mutaţii (în engleză *frameshift mutations*)**,** produc frecvent un codon stop în *aval* de locul deleţiei/inserţiei, rezultând o proteină trunchiată.

Deleţiile şi inserţiile câtorva nucleotide survin cel mai adesea la nivelul unor secvenţe scurte repetate în tandem, printr-un mecanism de *glisare sau derapare replicativă* (în engleză *slipped strand mispairing*), determinat de împerecherea decalată a acestor secvenţe repetate. Aşa cum se observă în figura 6.8, secvenţele repetate din catena nou sintetizată (de ex., CAG CAG...), se pot alinia greşit (glisează înainte sau înapoi) faţă de secvenţele repetitive complementare corespunzătoare ale catenei ADN matriţă (de ex., GTC GTC...). În funcţie de direcţia de glisare se produc în catena nou sintetizată inserţii (prin glisarea spre înapoi) sau deleţii (prin glisare spre înainte). Acest fenomen de glisare replicativă se produce frecvent în cazul microsateliţilor sau minisateliţilor determinând polimorfismul cunoscut al acestor secvenţe repetate în tandem de un număr variabil de ori (VNTR). El ar putea fi la originea expansiunii repetiţiilor trinucleotidice (vezi secţiunea 1.4). Unele gene implicate în etiologia unor boli (gena CF - pentru CFTR implicat în fibroza chistică; gena FIX - pentru factorul IX implicat în hemofilia B; gena APC - pentru polipomatoza adenomatoasă de colon, ş.a) posedă *în secvenţa codantă* o serie de repetiţii în tandem ale unui număr mic de nucleotide (figura

6.9), ce pot fi implicate în fenomenul derapării replicativ, producând deleţia sau inserţia unităţii repetitive, fapt ce va genera decalarea cadrului de lectură (o mutaţie *frameshift*).

1.3. REMANIERI GENICE ABERANTE

Remanierile genice aberante se realizează prin schimburi între secvenţe de ADN identice sau cvasi-identice, alelice sau nealelice şi generează deleţii şi inserţii mari, duplicaţii, inversiuni şi conversii genice. Comparativ cu alte tipuri de mutaţii descrise mai înainte, remanierile genice sunt mai rar întâlnite în etiopatogenia bolilor genetice dar relativ frecvente în anumite boli. De ex., 90% din cazurile de *amiotrofii spinale infantile* şi 60% din cazurile de miopatie Duchenne sunt produse prin deleţii genice importante.

a). Recombinări genice prin recombinare omologă nealelică (inegală sau ectopică).

Mecanismul principal al remanierilor genice este *recombinarea omologă nealelică (RON)(sau ectopică)* între secvenţe identice sau cvasi-identice situate (în câteva exemplare) în amplasări diferite ale cromosomilor (figura 6.10). Ea se produce de obicei în profaza meiozei I atunci când cei doi cromosomi omologi se împerechează greşit (prin secvenţele lor identice) – RON meiotică (intercromosomică) - sau, mai rar, în mitoză, prin schimb fie între cromosomii omologi, fie între cromatidele surori – RON somatică (intracromosomică sau intracromatidiană). Această recombinare (intermoleculară) poate duce fie la un schimb reciproc (CO) *inegal* (figura 6.11) prin care se modifică *ambele* cromatide (deleţie sau duplicaţie „în oglindă"; inversie), fie la o *conversie genică* care este un transfer *unidirecţional* de informaţie şi se modifică numai una dintre cromatide. Poate exista şi o recombinare intracromatidiană, între secvenţe omologe situate pe aceeaşi cromatidă. Aceste situaţii sunt ilustrate prin mai multe exemple.

- *Regiunea ce cuprinde gena ţintă este duplicată în tandem.* Astfel, genele α1 şi α2 ce codifică lanţurile de alfa-globină ale hemoglobinei sunt produse printr-o duplicaţie recentă; împerecherea greşită α1-α2 (figura 6.12) va genera, prin CO inegal, deleţia sau duplicaţia unei gene α Aceeaşi situaţie se întâlneşte şi pentru gena SMN (de la *survival motor neuron*), duplicată în regiunea 5q11.2-13.3; prin CO inegal se produce deleţia exonilor 7 şi/sau 8 a genei, ceea ce generează *amiotrofia spinală infantilă.*
- *Conversia genică este produsă prin schimburi nereciproce (unidirecţionale)*, de mărime variabilă (de la cîteva pb la cîteva kb) între gene vecine, foarte asemănătoare dar neidentice. Ele se pot împerechea greşit şi atunci una din gene - *donor* (desori o pseudogenă, inactivată prin mutaţii) - ramâne neschimbată iar cealaltă – *acceptor* - este modificată primind o parte din secvenţele donorului (figura 6.13). Exemplul cel mai tipic priveşte genele codante pentru 21-hidroxilază, CYP21A şi CYP21B, situate pe braţul scurt al cromosomului 6 în regiune HLA (vezi figura 3.3.c); numai gena CYP21B este funcţională, cealaltă genă - CYP21A - este o pseudogenă care a acumulat numeroase mutaţii inactivatoare. Circa 75% din cazurile de hiperplazie congenitală de suprarenală prin deficienţă de 21-hidroxilază sunt consecinţa mutaţiilor ce apar în gena CYP21B ca urmare a conversiei genice între pseudogena CYP21A şi gena funcţională CYP21B; restul cazurilor sunt produse prin deleţia genei CYP21B prin CO inegal (figura 6.14). Mecanismul de conversie genică pare implicat în generarea polimorfismului extrem al genelor complexului HLA.
- *Regiunea ce cuprinde gena ţintă este flancată/ încadrată de secvenţe repetitive scurte, identice*, care prin împerechere greşită şi CO inegal vor genera deleţia sau duplicaţia genei (figura 6.15). De ex., gena pentru proteina mielinei, PMP22, se află într-o regiune de 1,5Mb flancată de secvenţe identice de circa 30Kb (vezi figura 5.18 şi capitolul 5.C.1.3). După CO inegal se produce duplicaţia şi deleţia genei PMP22 care va genera două neuropatii ereditare diferite: boala Charcot-Marie-Tooth 1A şi, respectiv neuropatia ereditară cu pareze induse de presiune (HNPP).

- *Repetiţiile dispersate nealelice* (de tip *Alu*) predispun la aliniere greşită, CO inegal şi producerea de deleţii/duplicaţii; acest mecanism a fost identificat în gena receptorului pentru LDL, gena NF1, gena factorului IX al coagulării şi altele .
- *Pe acelaşi cromosom, în interiorul sau vecinătatea genei ţintă se găsesc secvenţe identice;* prin recombinare intracromosomică (deci intramoleculară) între două copii se poate produce deleţie sau inversii a unei mari părţi din genă. De ex., în intronul 22 al genei pentru factorul VIII al coagulării (Xp28) se află o mică secvenţă nucleotidică care se mai găseşte repetată, dar cu orientare opusă, de cel puţin două ori la extremitatea telomerică a genei (figura 6.16); prin recombinare între secvenţa intronică şi una din secvenţele omologe se produce o inversie a primilor 22 de exoni ai genei FVIII; această mutaţie recurentă produce circa 50% din cazurile severe de hemofilie A. Acelaşi fenomen se întâlneşte în boala Hunter, o mucopolizaharidoză legată de X.

Toate cazurile descrise mai sus fac parte din **bolile genomice** care sunt produse prin *recombinarea omologă nealelică* între regiuni specifice din genom, cu duplicaţii sau cu un număr mic de repetiţii identice sau foarte asemănătoare. Aceasta pare să fie un mecanism frecvent (10^{-4}) şi important de producere a unui nou tip de boli, numit *boli genomice* (Lupski, 1998) (vezi Caseta 6.3); ele sunt determinate de *„arhitectura"* specifică a genomului uman şi prin aceasta se deosebesc de bolile monogenice convenţionale, produse prin mutaţii specifice într-o genă (de obicei consecinţa unor erori de replicare şi/sau reparare). In funcţie de *mărimea* segmentului genomic implicat şi de numărul de gene localizate în segmentul remaniat – deleţia şi/sau duplicaţia rezultată prin recombinare aberantă (intercromosomică, intracromosomică sau intracromatidiană; (figura 6.17)- poate produce: o boală mendeliană (tabelul 6.1), un sindrom al genelor contigue sau o aberaţie cromosomică a unui braţ întreg.

Tabelul 6.1. Bolile genomice Mendeleene
(adaptat după Stankiewicz şi Lupski, 2002)

Boală	Cod OMIM	Mod de trans-mitere	Poziţie cromo-somică	Genă	Tip de rearanja-ment
Sindrom Bartter tip III	601 678	AD	1p36	CLCNKA/B	deleţie
Boală Gaucher	230 800	AR	1q21	GBA	deleţie
Nefronoftizie juvenilă familială	256 100	AR	2q13	NPHP1	deleţie
Distrofie musculară facio-scapulo-humerală	158 900	AD	4q35	FRG1?	deleţie
Atrofia musculară spinală	253 300	AR	5q13.2	SMN	inversie/ duplicaţie
Hiperplazia corticosuprarenală congenitală tip III (prin deficit de 21 hidroxilază)	201 910	AR	6q21.3	CYP21	deleţie
Aldosteronism cu răspuns la tratament cu glucocorticoizi (GRA)	103 900	AD	8q21	CYP11B1/2	duplicaţie
β-talasemie	141 900	AR	11p15.5	β-globină	deleţie
α-talasemie	141 800	AR	16p13.3	α-globină	deleţie
Boala polichistică renală tip 1 (ADPKD)	601 313	AD	16p13.3	PKD1	
Boala Charcot-Marie-Tooth (CMTA1)	118 220	AD	17p12	PMP22	duplicaţie
Neuropatia ereditară cu sensibilitate la pareze presionale (HNPP)	162 500	AD	17p12	PMP22	deleţie
Neurofibromatoza tip 1 (NF1)	162 200	AD	17q11.2	NF1	deleţie
Nanism hipofizar	262 400	AR	17q23.3	GH1	deleţie
Deficit farmacogenetic al CYP2D6	124 030	AR	22q13.1	CYP2D6	deleţie/ duplicaţie
Ihtioză	308 100	LX	Xp22.32	STS	deleţie
Dicromatopsie pentru vederea colorată roşu/verde	303 800	LX	Xq28	RCP şi GCP	deleţie
Incontinentia pigmenti	308 300	LX	Xq28	NEMO	deleţie
Hemofilia	306 700	LX	Xq28	F8	inversie
Distrofia musculară Emery-Dreifuss (EMD)	310 300	LX	Xq28	Emerină şi FLN1	deleţie/ duplicaţie/ inversie

Sindromul Hunter (mucopolizaharidoza tip III)	309 900	LX	Xq28	IDS	inversie/ deleţie

b). Remanieri genice prin recombinare neomologă sau nelegitimă

Remanierile genice se pot produce şi prin evenimente de recombinare neomologă sau nelegitimă între secvenţe care nu prezintă sau au o foarte mică omologie de secvenţă. Este cazul celor mai multe deleţii ale genei ce codifică distrofina. Nu se cunosc precis mecanismele moleculare ale recombinării nelegitime. Se crede că anumite elemente din structura genelor ar putea fi „puncte fierbinţi" pentru aceste recombinări: secvenţele alternante de purine-pirimidine, regiunile MAR (de la *matrix-associated region*) bogate în nucleotide A/T, situsurile de clivare ale topoisomerazelor, secvenţele în palindrom etc.

CASETA 6.3

Boli genomice

*Bolile genomice sunt afecţiuni care rezultă prin rearanjarea ADN din genomul uman, datorită recombinării dintre regiuni distincte omologe dar nealele („*paraloge*") (Lubski, 1998); aceste rearanjamente determină pierderea sau duplicaţia unei gene (sau unor gene). Bolile genomice sunt deci consecinţa arhitecturii speciale a unor regiuni din cromosom (sau cromosomi) spre deosebire de bolile monogenice convenţionale, produse prin mutaţii specifice într-o genă (datorită erorilor de replicare şi/sau reparare).*

Rearanjările se produc prin recombinare omologă nealelică *între regiuni specifice, de ~10-400 Kb, cu secvenţe identice sau asemănătoare. Acestea sunt frecvent* duplicaţii *segmentare („*dupliconi*") sau secvenţe cu un* număr mic de repetiţii *identice, localizate preferenţial în anumite segmente ale cromosomilor, frecvent la centromer sau telomere (estimări recente arată că ~5-10% din genomul uman este duplicat). Datorită omologiei lor, secvenţele respective se împerechează greşit şi determină prin recombinare omologă meiotică (intercromosomică) sau mitotică (intracromosomică: schimb între cromatidele surori sau intracromatidiană) (figura 6.10) rearanjări cromosomice sau cromatidiene (deleţii, duplicaţii, inversii, disrupţii genice).*

Recombinarea omologă nealelică mediată de secvenţe repetitive mici este un fenomen frecvent (10^{-4}) şi un mecanism major de producere a bolilor genetice. În funcţie de mărimea segmentului implicat (figura 6.17) şi de numărul de gene localizate în segmentul remaniat se pot produce: boli mendeliene (numeroase cazuri de: neurofibromatoza 1, nefronoftizia juvenilă familială, incontinentia pigmenti s.a.) (tabelul 6.1); sindroame cu microdeleţii (sdr. Williams, sdr. DiGeorge/Velocardiofacial etc); aberaţii cromosomice mari (inversii, isocromosomi X de braţ lung , cromosomi supranumerari bisatelitici etc).

*Folosirea unor metode noi de analiză (*hibridizarea genomică comparativă *– CGH - de înaltă rezoluţie, microcipuri cu BAC de genom uman) va duce probabil la descoperirea unor noi boli prin rearnjamente genomice submicroscopice.*

1.4. EXPANSIUNEA INSTABILĂ A REPETIŢIILOR TRINUCLEOTIDICE

După anul 1991 s-au descoperit peste 10 boli genetice produse prin **mutaţii instabile** sau **dinamice** ale unor *repetiţii trinucleotidice*[4]; trei dintre acestea sunt relativ frecvente: retardul mintal cu X fragil (FRAXA), distrofia miotonică (sau boala Steinert) şi boala (coreea) Huntington (tabel 6.2). Aceste afecţiuni se caracterizează prin *expansiunea instabilă* a unui segment de ADN ce conţine o repetiţie de trei nucleotide (CAG, CTG, CGG sau GAA), dispuse în tandem (deci adiacente); aceste repetiţii se pot găsi în exoni, la capetele 5' sau 3' ale genei, sau în introni. Pe măsură ce gena trece de la o generaţie la alta, numărul de repetiţii trinucleotidice creşte progresiv, suferă o expansiune, şi când depăşeşte un *anumit prag critic* produce anomalii în expresia genei sau funcţia proteinei codificată de genă.

[4] S-a stabilit prin convenţie (1993) că nomenclatura tripletelor repetitive să se facă în ordinea alfabetică a bazelor azotate şi în direcţia 5'→3'.

Tabelul 6.2. Exemple reprezentative de boli prin repetiţii trinucleotidice

Boala	Localizarea genei	Mod de transmisie	Repetiţie	Localizarea repetiţiei	Număr de repetiţii			Efect parental
					Alela normală	Pre-mutaţie	Mutaţie completă	
Sindromul X fragil (FRAXA) (1:4000)	Xq27.3	DLX (anticipaţie)	CGG	5'UT	< 60	60-200	> 200	matern
Distrofia miotonică (1:8000)	19q13.3	AD (anticipaţie)	CTG	3'UT	< 30	50-80	> 80	matern
Ataxia Friedreich (1:50.000)	9q13	AR	GAA	Intron 1	< 25	36 -100	> 100	matern
Boala Huntington (1:12.000)	4p16.3	AD (anticipaţie)	CAG	Regiune codantă	< 36	?	> 35	patern

Identificarea acestui mecanism mutaţional nou a fost o surpriză deoarece:

- se deosebeşte fundamental de restul mutaţiilor, *permanente şi stabile* care, o dată produse, acestea se transmit nemodificate în succesiunea generaţiilor şi sunt prezente la toţi bolnavii dintr-o familie;
- iniţial se credea că acest tip de mutaţii dinamice nu se găsesc decât la om; ulterior au fost identificate şi la alte specii, dar mult mai rar;

Genomul uman conţine numeroase *secvenţe repetitive* care ocupă poziţii cromosomiale fixe (loci) şi a căror complexitate variază de la gene integrale (de ex., genele pentru ARN ribosomal) la tracturi formate prin repetarea unuia sau câtorva nucleotide *(microsateliţi)*. Printre cele mai simple şi mai frecvente sunt repetiţiile unor mononucleotide SNP (de la *single nucleotid polimorfism*), repetiţiile dinucleotidelor AC, repetiţiile unor trinucleotide sau, mai rar, a unor secvenţe mai lungi – repetate succesiv, în tandem. Funcţiile repetiţiilor simple sunt încă neelucidate dar foarte probabil ele nu sunt "inerte" funcţional; Numărul de repetiţii variază de la un individ la altul, ceea ce face ca secvenţa respectivă să fie *polimorfică* în populaţie. Aceste secvenţe repetate sunt în general *stabile*, fiind transmise identic la generaţiile următoare şi putând servi atunci ca marker genetic.

- În unele cazuri, o repetiţie trinucleotidică moderat amplificată (probabil prin CO inegal) poate produce boală dar repetiţia este *perfect stabilă* şi se transmite fără modificări de mărime în mai multe generaţii; de ex. o expansiune trinucleotidică stabilă în gena *HOXD13* produce o polisindactilie.
- În alte cazuri, numărul de repetiţii trinucleotidice al secvenţei poate să crească în succesiunea generaţiilor, realizând o *expansiune progresivă* sau brutală a secvenţei repetate, care este numită *instabilă*. În aceste cazuri, dacă secvenţa se găseşte în interiorul sau vecinătatea unei gene, se produce o alterare a expresiei genei ce conţine secvenţa şi deci o stare de boală.
- În afara expansiunii repetiţiilor trinucleotidice instabile există foarte probabil si expansiuni ale altor tipuri de repetiţii. Astfel, o expansiune a unei repetiţii de 12 nucleotide în gena *cistatin B* produce epilepsia mioclonică progresivă.

La bolile prin repetiţii trinucleotidice ne vom referi în detaliu în capitolul 11.D dar aici vom preciza că modul lor de transmitere prezintă două caracteristici neobişnuite: există o creştere a riscului de apariţie a bolii sau a severităţii şi precocităţii manifestărilor clinice în succesiunea generaţiilor (*anticipaţie*); formele cele mai severe se transmit de preferinţă printr-unul din părinţi ("*efect parental*").

Expansiunea instabilă a repetiţiilor trinucleotidice este un mecanism nou şi neaşteptat, care ridică în discuţie trei întrebări majore:

- cum se produce boala prin aceste expansiuni?
- care este mecansimul instabilităţii şi expansiunii?
- cum au apărut aceste mutaţii în populaţiile umane şi, mai ales, cum au putut să se menţină la un nivel atât de ridicat?

a. Mecanismul de producere a bolii prin expansiuni trinucleotidice.

Caracteristica definitorie a mutaţiilor dinamice o constituie **instabilitatea** lor, exprimată cel mai adesea prin creşterea numărului de copii trinucleotidice[5]. Instabilitatea devine manifestă cu ocazia diviziunilor pe care le realizează celula purtătoare, fie în timpul transmiterii de la părinţi la descendenţi (instabilitate intergeneraţională sau "*instabilitate meiotică*"), fie prin mitoză, producând variaţii de mărime în ţesuturile unui individ afectat (mozaicism somatic sau "*instabilitate mitotică*"). Instabilitatea se exprimă clinic sub formă de boală când este depăşit un anumit *prag critic* de repetări. Sub pragul critic variaţiile numărului de repetiţii trinucleotidice generează polimorfisme ADN *benigne*. O nouă traversare a meiozei, de această dată în gonadele bolnavilor, se soldează – cel mai frecvent – cu expansiuni adiţionale care, în generaţia următoare, vor imprima o simptomatologie mai severă şi vor precipita debutul clinic, la o vârstă mai precoce. Acest fenomen, denumit **anticipaţie**, caracterizează aproape toate bolile prin repetiţii trinucleotidice descrise până în prezent, dar se manifestă şi în alte afecţiuni cu mecanism patogenic neclar.

Intensitatea de manifestare a bolii la descendenţi este proporţională cu *dimensiunile* secvenţei amplificate şi depinde uneori de *sexul părintelui* prin care se face transmiterea: în sindromul X fragil şi distrofia miotonică boala este mai gravă dacă transmiterea se face de către mamă, în timp ce în boala Huntington gravitatea formei clinice este mai mare când boala este transmisă de către tată. Mecanismul acestui "*efect parental*" este necunoscut.

Genele ce conţin expansiuni trinucleotidice instabile se împart în două clase majore:

(1).Gene care prezintă expansiuni *foarte mari* ale unor repetiţii (CGG, CCG, CTG, GAA), localizate în secvenţele *necodante* ale genei – în promotor, regiunile 5' şi 3' transcrise dar netranslate sau în introni (tabelul 6.2, primele trei exemple). Expansiunea lor masivă *blochează transcripţia* genei şi produce *pierdera funcţiei genei*.

Alelele normale şi stabile au de obicei 5-50 repetiţii; alelele cu mărime intermediară - între 25-200 repetiţii - sunt nepatogene (atenţie: pragul critic este destul de mare) dar foarte instabile. Creşterea treptată a numărului de repetiţii accentuează instabilitatea şi realizează, în apropierea pragului critic, o **premutaţie.** Purtătorii de premutaţii sunt fenotipic normali dar vor avea descendenţi afectaţi deoarece în celulele lor germinale se produce o expansiune bruscă a premutaţiei care, prin depăşirea pragului critic de repetiţii, devine **mutaţie completă.**

(2). Gene ce prezintă o expansiune *moderată* a tripletului CAG (ce codifică glutamina) în secvenţele *codante* (tabelul 6.2, exemplul patru); această expansiune nu modifică transcripţia şi translaţia dar alterează structura şi *funcţia proteinei* codificate (generând o secvenţă poliglutaminică anormală). Alelele normale şi stabile au 10-30 repetiţii, ele devin (ocazional) patogene la un *prag critic foarte îngust*[6] şi determină *o alterare specifică a anumitor neuroni*[7]. Cu cât repetiţia este mai mare cu atât boala debutează la o vârstă mai precoce. Acest mod de acţiune - după cum se vede diferit de primul grup - rămâne enigmatic.

Prezenţa unui mecanism unic de mutaţie (sau predominant) face ca identificarea mutaţiei prin analiza ADN să fie cel mai bun mijloc de diagnostic exact a fiecăreia dintre bolile prin expansiunea repetiţiilor trinucleotidice.

b. Mecanismul expansiunii repetiţiilor trinucleotidice.

Mecanismul expansiunii nu se cunoaşte exact dar probabil este *identic* la toate tipurile de repetiţii trinucleotidice. Cel mai probabil expansiunea se produce prin fenomenul de *glisare sau derapare replicativă* (descris mai sus; figura 6.8), determinat de alinierea greşită şi împerecherea decalată a repetiţiilor trinucleotidice. O dovadă: repetiţiile „întrerupte" prin introducerea unui triplet diferit (de ex., CAT în repetiţia CAG) sunt stabile comparativ cu

[5] Repetiţiile instabile sunt totdeauna modificate când sunt transmise de la părinţi la copii. Se produc şi expansiuni şi regresii (contracţii) dar, pentru motive neclare, predomină expansiunile.

[6] Imediat sub prag repetiţia este nepatogenă, imediat peste prag ea produce boală.

[7] Unii autori consideră că tractul poliglutaminic din produsul genei determină agregarea proteinei în anumite celule, pe care le omoară; alţii cred că regiunea poliglutaminică ar interfera activitatea enzimei glicolitice *gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza* determinând o reducere masivă a producţiei de energie din glucoză; stresul metabolic este sever în neuroni, care obţin energie *numai* din glucoză.

repetiţiile „omogene”. S-a sugerat că regiunile cu repetiţii trinucleotidice pot forma, dincolo de un anumit prag de lungime, structuri spaţiale anormale ale ADN (în „ac de păr” sau „triplu helix”) care perturbă replicarea şi favorizează derapajul replicativ.

Există o serie de dovezi care susţin rolul fragmentelor Okazaki în expansiunea repetiţiilor trinucleotidice. Unele repetiţii trinucleotidice (precum CCG în *sindromul X fragil* sau CAG în *distrofia miotonică*) prezintă o distribuţie bimodală a instabilităţii, cu o graniţă între modificările minore şi cele majore ale numărului repetiţiilor trinucleotidice care este aproximativ egală cu dimensiunea unui fragment Okazaki. De asemeni, structurile secundare CAG/CTG şi repetiţiile CGG pot inhiba activitatea endonucleazei FEN1 implicată în procesarea fragmentelor Okazaki. Drojdiile mutante pentru Rad27 (echivalentul FEN1) prezintă tendinţa spre instabilitatea numărului secvenţelor repetitive.

Mecanismul de glisare replicativă ar trebui să producă şi *contracţii* – prin deleţii - alături de expansiuni (vezi figura 6.8) dar acest fenomen este rar şi deloc instabil; nu se ştie încă de ce se produc cu predilecţie mai ales expansiuni. De asemenea nu se ştie dacă modificările repetiţiilor trinucleotidice la transmiterea intergeneraţii se produc în gametogeneză, la fecundarea sau în primele diviziuni din embriogeneză. În sfârşit, trebuie spus că glisarea replicativă a fost implicată şi în fenoemnul de *instabilitate a microsateliţilor* din anumite cancere dar bolile prin repetiţii trinucleotidice nu se asociază cu un defect din repararea ADN şi nici cu o incidenţă crescută a neoplaziilor.

Există şi date care contrazic rolul replicării ADN în expansiunea repetiţiilor trinucleotidice. Astfel, au fost identificate modele animale pentru boala Huntington la care se constată o creştere marcată a numărului repetiţiilor CAG la nivelul neuronilor din striatum. Aceşti neuroni nu mai suferă diviziuni celulare, ceea ce arată că expansiunea repetiţiilor trinucleotidice a aparut independent de replicare.

c. Originea mutaţiilor prin expansiunea repetiţiilor trinucleotidice.

Se pune firesc întrebarea: cum s-au putut menţine la un nivel de frecvenţă populaţională ridicat două dintre bolile prin repetiţii trinucleotidice – sindromul X fragil (transmitere legată de X) şi distrofia miotonică (DM) (transmitere autosomal dominantă) – care reduc firesc eficacitatea reproductivă (*fitness*)? Un răspuns „imediat” ar fi: o producţie foarte mare de mutaţii noi. Dar, neaşteptat, s-a descoperit că în cele două boli există *un dezechilibru de înlănţuire*[8] între markeri polimorfici apropiaţi de genă, sugerând astfel un *efect de fondator!* Analiza locusului DM relevă că 10% din populaţie are *o alelă normală lungă* (cu 20-30 CTG) ce constituie *rezervorul* mutaţiilor recurente, evoluând în mai multe generaţii spre „lungimea patologică”. Aceste alele lungi normale au apărut printr-un eveniment ancestral unic, fapt ce explică dezechilibrul de înlănţuire observat pentru alelele patologice. Date asemănătoare se cunosc şi despre coreea Huntington: alelele patologice provin de la un tată sănătos, purtător al unei alele lungi normale (30-35 repetiţii)

1.5 MECANISME RARE

- Genomul uman conţine un număr mare de secvenţe repetate *dispersate*, în special secvenţe scurte (300 pb) de tip *Alu,* din familia SINE, sau secvenţe mai lungi (3-7 kb) din familia LINE, derivate din retrotransposoni (vezi capitolul 2.C.2.2). Unele secvenţe pot fi active şi sunt capabile de transpoziţie prin ARN intermediar, inserându-se aleatoriu în genom; dacă inserţia se face în exoni, atunci se întrerupe secvenţa ce codifică o proteină; dacă inserţia se face în introni poate fi afectată matisarea lor. Astfel, s-au descris cazuri de hemofilie A, distrofie musculară Duchenne, polipoză de colon produse prin inserţia unei repetiţii LINE 1 sau de neurofibromatoză 1 cauzate de inserţia unui element transpozabil activ *Alu.* Mecanismul de mutageneză inserţională pare, din fericire, puţin activ la om.
- Rearanjările cromosomice, de tipul translocaţiilor reciproce echilibrate, care au punctul de ruptură în interiorul unei gene, pot produce inactivarea ei. Acest mecanism este foarte rar dar important pentru localizarea foarte precisă şi apoi clonarea genei implicate.

[8] Existenţa dezechilibrului de înlănţuire exclude posibilitatea ca expansiunile trinucleotidice să rezulte prin mecanisme de recombinare.

2. CONSECINŢELE GENOTIPICE ŞI FENOTIPICE ALE MUTAŢIILOR GENICE

Consecinţele mutaţiilor genice asupra genotipului şi expresiei sale fenotipice sunt complexe şi dependente de factori multipli. Analiza este dificilă, datorită volumului mare de informaţii, iar prezentarea lor nu poate fi decât sintetică şi schematică.

2.1. MUTAŢII ÎN GENOMUL NUCLEAR ŞI MITOCONDRIAL

Cele mai multe mutaţii genice afectează *genomul nuclear* şi, din acesta, ADN extragenic, care reprezintă imensa majoritate a genomului. Se produce astfel un foarte amplu *polimorfism al ADN*, care însă nu are consecinţe fenotipice. În felul acesta marea majoritate a mutaţiilor nu au consecinţe asupra individului şi se poate spune că „soluţia imensităţii ADN extragenic, necodant" este benefică pentru evoluţie. Din fericire, aceasta nu este unica „soluţie de protecţie" din natură: să ne amintim de existenţa ADN necodant din structura genelor, precum şi de mutaţiile sinonime („silenţioase") sau de cele conservative (vezi secţiunea B.1.1). Practic, numai anumite alterări în structura şi expresia genică vor fi implicate în producerea unor boli, dar despre acestea vom discuta în secţiunea următoare.

Genomul mitocondrial reprezintă doar circa 1/200.000 din mărimea genomului nuclear. ADNmt se găseşte în mii de copii în fiecarea celulă somatică; dacă se produce o mutaţie într-o singură moleculă de ADNmt se poate presupune că şansa „fixării" ei va fi foarte mică şi deci rata mutaţiilor mitocondriale cu efect patogen va fi foarte joasă. Totuşi, frecvenţa bolilor mitocondriale este suficient de mare pentru a considera genomul mitocondrial ca o ţintă preferată („un punct fierbinte") a mutaţiilor. Acest paradox se poate explica prin:

- procentajul foarte mare al regiunilor codante din ADNmt (93% vs 3% în genomul nuclear);
- rata foarte înaltă a mutaţiilor la nivelul ADNmt, supus unui „bombardament" continuu de către speciile reactive de oxigen (produse de catena respiratorie din mitocondrii) şi neprotejat de către histone; ADNmt suferă mai multe runde de replicare decât ADN cromosomic iar sistemele de reparare a leziunilor ADNmt sunt reduse şi puţin eficace;
- rata foarte mare de fixare a mutaţiilor în ADNmt

Deci rata mutaţiilor în ADNmt este foarte mare datorită combinaţiei dintre instabilitatea crescută a ADNmt şi rata înaltă de fixare a mutaţiilor.

2.2 CONSECINŢELE MUTAŢIILOR ASUPRA INFORMAŢIEI ŞI EXPRESIEI GENICE.

Consecinţele genotipice ale mutaţiilor genice depind în principal de *tipul şi localizarea mutaţiilor* în structura genei.

a). Efectul tipului de mutaţie.

Efectul tipului de mutaţie – microleziuni (substituţii, deleţii şi inserţii nucleotidice mici) sau macroleziuni / remanieri genice (deleţii, duplicaţii, inserţii, inversii etc) – asupra informaţiei genice a fost discutat în secţiunea anterioară. Fără a reveni, vom reaminti că substituţiile se produc cel mai frecvent în secvenţele codante determinând, prin mutaţii nesinonime, modificări ale secvenţei de aminoacizi ale proteinelor iar deleţiile şi inserţiile mici (non-multiplu de trei) produc decalarea cadrului de lectură şi o proteină complet anormală. Remanierile genice importante determină o perturbare a expresiei genice afectând transcripţia, procesarea ARNm, translaţia sau stabilitatea proteinelor.

b). Efectul localizării intragenice a mutaţiei.

Orice componentă din structura genei (vezi 3.B.1) poate fi afectată de mutaţii (figura 6.6). În funcţie de localizarea intragenică vom deosebi trei categorii principale de mutaţii:

- *mutaţii în regiunile codante* – determină sinteza unei proteine cu o structură anormală a cărei funcţie va fi de obicei redusă sau abolită, mai rar crescută sau modificată, diferită de funcţia iniţială;
- *mutaţii care afectează matisarea ARNm precursor sau stabilitatea ARNm matur* – produc, în funcţie de mecanism, fie o proteină anormală, fie o modificare a cantităţii de proteină normală sintetizată;
- *mutaţii care afectează dozajul genic (deleţii, duplicaţii) sau reglarea procesului de transcripţie* – determină scăderea sau creşterea sintezei proteice, mai rar o expresie inadecvată ca timp şi spaţiu.

În esenţă, mutaţiile – în diferite regiuni din structura genei – produc fie o modificare a structurii proteinei, fie o perturbare a diferitelor etape ale expresiei genice (la nivelul transcripţiei, procesării şi maturării ARNm precursor, al translaţiei sau stabilităţii proteinei).

(1).*Transcripţia.* Mutaţiile pot afecta transcripţia alterând elemente diferite necesare reglării acestui proces.

- Secvenţele regiunii promotor (de ex. a genei codante pentru β-globină) pot fi modificate de mutaţii diverse care vor altera legarea factorilor de transcripţie; în acest context vom sublinia că există şi mutaţii ale genelor ce codifică factori de transcripţie, deseori letale sau producând anomalii de dezvoltare;
- Secvenţele 5'UTR sau 3'UTR, transcrise dar netranslate, din primul şi ultimul exon al genei, pot suferi mutaţii ce modifică rata sintezei proteice. Au fost descrise mutaţii ale secvenţei 5'UTR în gena pentru factorul IX ce produce hemofilia B Leyden şi în gena FMR1 care determină sindromul X-fragil sau ale secvenţei 3'UTR în gena DM ce produce boala Steinert.

(2). *Maturarea ARN premesager în ARNm*. Mutaţiile pot afecta matisarea şi poliadenilarea ARNm precursor (vezi capitolul 4.B.2.b).

- Alterarea (prin substituţie) a situsurilor de decupare a intronilor[9] – situsul donor (5'-GT) sau acceptor (AG-3') – face ca excizia să se producă la următorul exon şi astfel se va încorpora în ARNm matur o parte sau întregul intron sau va lipsi un exon[10] (în funcţie de situsul afectat). Ambele situaţii au consecinţe importante asupra expresiei genei (ARNm instabil; polipeptid nefuncţional).
- Activarea, prin mutaţie, a unui situs criptic de decupare (dintr-un exon sau intron) va antrena o competiţie cu situsurile normale în cursul procesului de maturare a ARNm; aceste mutaţii pot produce o proteină trunchiată cu activitate funcţională nulă sau foarte redusă (în funcţie de exonul afectat) sau vor bloca transcripţia (când se produc în introni)

(3). *Translaţia ARNm în proteină.*

- Mutaţiile codonului iniţiator, mutaţiile cu decalarea cadrului de lectură (*frameshift*) sau mutaţiile non-sens determină de regulă absenţa formării proteinei codificată de gena ce a fost modificată sau producerea unei proteine trunchiate.
- Mutaţiile cu sens greşit modifică semnificaţia unui codon şi consecinţele lor sunt variabile după natura schimbării şi amplasarea în proteină a aminoacidului modificat. Mutaţiile *nesinonime* pot afecta stabilitatea proteinei, localizarea intracelulară, maturarea proteinei, asamblarea ei în structuri multimerice, interacţiunile cu liganzii sau alte proteine, situsul funcţional pentru activitatea enzimatică etc). Mutaţiile *sinonime* (sau neutre) sunt însă fără efect (exceptând situaţiile de activare a unui situs criptic de matisare).
- Mutaţiile în codonul terminator vor duce la încorporarea adiţională de aminoacizi în proteină, care va deveni instabilă.

2.3. EFECTUL FENOTIPIC AL MUTAŢIILOR PATOGENE

[9] In engleză se numesc *splice site mutations.*
[10] În engleză se numeşte *exon skipping*

Alterând funcţia unei proteine, mutaţiile pot avea consecinţe patologice majore, fiind astăzi unanim recunoscute ca o cauză importantă de boală sau predispoziţie la îmbolnăvire.

Efectul fenotipic al mutaţiilor patogene depinde de mai mulţi factori:

- efectul mutaţiilor asupra funcţiei proteinei; în esenţă este vorba de *pierderea* şi *câştigul* de funcţie, dar aceste aspecte sunt mai complexe şi vor fi nuanţate şi detaliate mai jos;
- tipul şi funcţia proteinei: enzimă, proteină structurală, receptor membranar, canal ionic etc;
- gradul în care fenotipul anormal va fi exprimat la heterozigoţi; în bolile recesive prezenţa unei alele normale la heterozigoţii *N/a* poate fi suficientă pentru menţinerea unei stări normale; în unele boli dominante heterozigoţii *A/n* au un fenotip mai puţin modificat comparativ cu homozigoţii *A/A*;
- gradul în care expresia genei mutante va fi influenţată de alte *gene modificatoare* care generează un fond genetic diferit la persoane diferite;
- natura celulelor (germinale sau somatice) şi proporţia de celule (în mozaicurile somatice) care au gena mutantă; mutaţiile moştenite de la părinţi, prin gameţi, sunt prezente în toate celulele unui individ; mutaţiile somatice vor avea efecte dependente de momentul ontogenetic în care se produc şi, în consecinţă, de proporţia celulelor ce formează clona anormală;
- originea parentală a mutaţiilor, în cazul genelor cu *amprentare parentală.*

Asupra unora din aceşti factori, ce influenţează în esenţă ereditatea monogenică, ne-am referit în capitolul anterior şi vom reveni cu detalii şi exemple în capitolul 11.A. Considerăm totuşi utile pentru înţelegerea efectelor mutaţiilor câteva precizări sintetice despre *efectul mutaţiilor asupra funcţiei proteinei.*

Mutaţiile patogene, cauzatoare de boală, pot avea – în funcţie de tipul şi mecanismul de acţiune – patru tipuri de efecte asupra funcţiei proteinei codificată de gena care a suferit mutaţia.

(1) Pierderea funcţiei. Numeroase tipuri de mutaţii pot produce o pierdere totală sau parţială a activităţii normale a genei şi deci a expresiei proteinei. Aceste mutaţii sunt la originea majorităţii bolilor cu transmitere recesivă, care se manifestă la homozigoţi sau heterozigoţi compuşi (ambele gene alele sunt modificate); ele se pot găsi şi în unele boli cu transmitere dominantă prin *haploinsuficienţă*, cum ar fi hipercolesterolemia familială, în care formele heterozigote sunt mult mai puţin severe decât cele homozigote; totuşi pierderea a 50% din activitatea genei este suficientă pentru producerea bolii.

(2) Câştigul de funcţie. Mutaţiile asociate cu un câştig de funcţie a proteinei sunt mult mai rare; ele pot acţiona fie prin creşterea nivelului de expresie a proteinei (de exemplu, prin creşterea dozajului genic), fie prin creşterea abilităţii proteinei de a-şi efectua funcţia normală proteinei (de exemplu, activarea permanentă a unui receptor, în absenţa ligandului).

(3) Achiziţia unor proprietăţi noi de către proteina mutantă, prin mecanisme diverse:

- modificarea proprietăţilor structurale ale proteinei ce tinde să polimerizeze sau să se agrege (mutaţii ale genei β-globinei în sicklemie sau mutaţii ale genelor asociate cu amiloidoza);
- achiziţia unei funcţii noi (varianta α1-antitripsină Pittsburg nu mai acţionează ca o anti-elastază ci ca un puternic inhibitor al factorilor de coagulare);
- producţia unei proteine toxice (gena ce codifică precursorul peptidului pentru β-amiloid şi produce forme precoce de boală Alzheimer);
- participarea polipeptidului mutant la formarea unor complexe multimerice, alături de proteine normale, face ca întregul complex să fie anormal sau nefuncţional; acest efect a fost numit "dominant negativ" (de exemplu, genele *COL1A1 sau COL1A2* ale colagenului).

(4) Expresia inadecvată a genei fie ca timp (*expresie heterocronică*), fie ca loc (*expresie ectopică*), fie ambele. În această categorie se încadrează *persistenţa ereditară a*

hemoglobinei fetale sau expresia inadecvată a *oncogenelor*, în celule în care aceste gene nu sunt normal exprimate.

2.4. CORELAŢII DINTRE GENOTIP ŞI FENOTIP

Studiul mutaţiilor patogenice, cauzatoare de boală, a dus la o mai bună înţelegere a relaţiilor dintre genotip şi fenotip în bolile genetice. Desigur, relaţia clasică *„o genă → un caracter (boală)"* ce stă la baza eredităţii monogenice ramâne valabilă pentru multe boli dar aceasta nu este singura corelaţie posibilă între genotip şi fenotip. Cu riscul de a reveni asupra unor aspecte discutate, dar pentru a asigura o înţelegere completă a problemei, vom preciza aceste posibile corelaţii.

O genă → o boală. Multe afecţiuni monogenice sunt produse de mutaţia unei anumite gene. Totul pare simplu şi clar. În realitate, posibilităţile actuale de analiză a genei şi, implicit, de identificare a mutaţiilor au arătat că lucrurile nu sunt simple iar problema corelaţiei genotip-fenotip este destul de complexă. În unele boli (sicklemie, acondroplazie, boala Huntington, ş.a) mutaţia este unică, deoarece produce maladia printr-o modificare funcţională foarte precisă a proteinei sau a expresiei genei. În alte afecţiuni o anumită mutaţie este preponderentă, datorită unui *„punct fierbinte*" din structura genei ce determină recurenţa mutaţiei (inversia în hemofilia A, deleţia în amiotrofia spinală, expansiunea trinucleotidică în sindromul X-fragil etc). În numeroasele boli produse prin pierderea funcţiei unei proteine heterogenitatea mutaţiilor din genă este aproape regula (de exemplu, mai mult de 130 de mutaţii în β-talasemie şi peste 600 în fibroza chistică). Spectrul mutaţiilor reflectă sensibilitatea genei la diferite mecanisme mutaţionale iar corelaţia dintre anumite mutaţii şi anumite manifestări clinice ramâne a fi definită în viitor.

O genă → mai multe boli. Există numeroase exemple care demonstraează că mutaţii produse într-o singură genă determină boli distincte, diferite. După un studiu a lui Pearson (1996) pe 750 de gene indexate în OMIM, 100 produceau prin mutaţii mai multe boli (2-7) diferite (în total 248). Citãm cîteva exemple:

- mutaţiile genei pentru *beta-globină* (pe cromosomul 11pter) produc sicklemia (AR), β-talasemia (AR), methemoglobinopatia (AD) şi o hemoglobina instabilă (AD);
- mutaţii în gena *RET* (11q12) (ce codifică un receptor tirozinkinazic, implicat în migrarea celulelor din creasta neurală) produc boala Hirschprung şi trei forme de cancer ereditar al glandelor tiroidă şi suprarenală (neoplaziile endocrine multiple *MEN2A* şi *MEN2B* precum şi *cancer medular tiroidian*); un al treilea grup de mutaţii în gena *RET* produc ambele boli la acelaşi individ;
- gena *LICAM* (pe cromosomul Xq28) prezintă mutaţii în hidrocefalia prin stenoza apeductului Sylvius, sindromul MASA (*mental retardation, aphasia, shuffing gait, adducted thumbs* = retard mintal, afazie, mers "târşâit" - spastic şi adducţia policelor) şi paraplegia spastică 1;
- gena *COL1A2* este implicată în patru forme diferite clinic de osteogenesis imperfecta şi sindromul Ehlers-Danlos tipul VII B;
- mutaţiile genei *FGFR2 (receptorul factorului de creştere fibroblastică 2)* produc trei sindroame diferite cu craniostenoză, numite Crouzon, Pfeiffer şi Jackson-Wiess.

Mai multe gene → o boală. Este vorba de *heterogenitatea nonalelică*, de locus, în care mutaţii în gene diferite se manifestă fenotipic identic sau foarte asemănător; în capitolul 4.A.5 şi tabelul 4.1 am discutat mai multe exemple, precum şi importanţa practică a acestui fenomen relativ frecvent.

Vom mai adăuga un exemplu ilustrativ: **boala Hirschprung** (*„megacolonul congenital"*) – caracterizată prin dezvoltare insuficientă a ganglionilor colonici, care produce secundar hipomotilitatea şi distensia colonului, constipaţie severă cronică – se poate prezenta fie ca o formă izolată, fie ca o componentă a unor sindroame plurimalformative (sindromul Down, sindromul Waardenburg). Formele izolate au fost considerate mult timp ca fiind un exemplu de ereditate multifactorială. Studii recente au arătat că cel puţin jumătate din cazurile familiale şi 20% din cazurile sporadice de boală Hirschprung sunt determinate de o

mutaţie într-una din următoarele cinci gene diferite: gena RET (*„Rearranged during Transfection*), care codifică un receptor pentru tirozin-kinaze, ligandul său GDNF, gena pentru receptorul B al endotelinelor (*EDNRB*), gena pentru *endotelina 3* (*EDN3*) şi gena pentru enzima de conversie a endotelinei (*ECE1*). Vom mai adăuga faptul că în sindromul Waardenburg (pete hipopigmentate ale pielii sau meşă albă frontală, surditate neurosensorială, megacolon congenital) intervine o genă ce codifică factorul de transcripţie *SOX10.*

Ereditatea digenică: două gene pentru un fenotip. Boala apare prin mutaţii concomitente în două gene nealele; de exemplu, o formă de *retinită pigmentară* este produsă numai dacă se produc concomitent mutaţii în gena *RDS* (pe cromosomul 6p)şi în gena *ROM* (pe cromosomul 11q).

O mutaţie → nu determină totdeauna acelaşi fenotip. Fenotipul produs de o mutaţie poate fi influenţat de acţiunea altor gene (de exemplu o aceiaşi mutaţie – C342R – în gena *FGFR2* poate produce sindromul Crouzon sau sindromul Pfeiffer) sau de factori de mediu (de exemplu, mutaţia în gena *PAH* poate produce prin deficienţa fenilalanin hidroxilazei fenilcetonuria cu retard mintal sever, sau ramâne fără efect dacă bolnavii sunt depistaţi la naştere şi primesc o dietă fără fenilalanină).

Mutaţii în aceeaşi genă → forme dominante sau recesive ale bolii. Deficienţa în factorul von Willebrand este o tulburare a coagulării sângelui relativ frecventă (vezi capitolul 11.E) Unele mutaţii (deleţii, nonsens, frameshift) în gena *VWF* (pe cromosomul 12p) produc o formă de boală cu transmitere recesiv autosomală iar alte mutaţii (mai ales substituţii cu sens greşit) determină forme dominante

3. CAUZELE ŞI FRECVENŢA MUTAŢIILOR GENICE

Mutaţiile genice se pot produce spontan, natural, cel mai frecvent prin erori accidentale în cursul replicării, sau pot fi induse de agenţi exogeni sau endogeni, numiţi mutageni. Aceste cauze – spontane sau induse – generează multiple şi frecvente leziuni ale ADN, care au un potenţial nociv major asupra informaţiei ereditare.

O clasificare simplă a diverselor tipuri de leziuni ale ADN permite gruparea lor în trei mari categorii:

- Alterări ale bazelor purinice sau pirimidinice: dezaminări spontane, metilări, adiţii variate, substituţii sau pierderea lor şi crearea de situsuri abazice ;
- Formarea de punţi intra- sau intercatenare (prin agenţi intercalanţi);
- Rupturi simple, monocatenare, şi bicatenare

Din fericire există în organism mecanisme de reparare eficace care reduc substanţial efectul defavorabil al mutaţiilor.

3.1. MUTAŢII SPONTANE

Schematic, se pot deosebi două mecanisme de generare a mutaţiilor spontane

(1). Cea mai importantă sursă de leziuni ADN o reprezintă însuşi *procesul de replicare*. În cursul replicării semiconservative (vezi 5.A.3.2) fiecare catenă a ADN „parental" serveşte ca matriţă pentru sinteza unei noi catene; acest proces, efectuat de polimeraze, implică recunoaşterea unei baze din catena matriţă şi adăugarea complementară a unui nucleotid la capătul 3' al catenei ce se sintetizează. ADN polimeraza δ catalizează împerecherea corectă a A cu T şu G cu C, făcând rareori erori. Şi totuşi, datorită unui fenomen de *tautomerie* (ce implică deplasarea unui atom de hidrogen din nucleotid), acestea pot forma structuri alternative care fac ca bazele să se împerecheze greşit (*"mismatch"*). ADN polimerazele corectează în mare măsură aceste erori. Acestea sunt mai rare în cazul ADN polimerazei delta, principala polimeraza implicată în replicarea ADN, dar relativ frecvente în cazul altor polimeraze. Pe ansamblu, erorile care rezultă în urma procesului de replicare au o frecvenţă de aproximativ 50.000/genom/zi. Dar organismul uman posedă alte sisteme de reparare care determină ca rata erorilor de împerechere apărute în cursul unei runde de replicare să fie extrem de redusă, de circa o încorporare greşită la $10^9 – 10^{10}$ nucleotide.

(2). Există leziuni care pot să apară spontan, în *condiţii fiziologice,* în absenţa replicării. De

exemplu, hidroliza reziduurilor nucleotidice poate să conducă la *situsuri abazice;* apariţia lor poate fi favorizată de temperaturi crescute şi acidifierea mediului celular. *Dezaminarea spontană* a citozinei, adeninei, guaninei sau 5-metilcitozinei poate conduce la formarea uracilului, hipoxantinei, xantinei şi, respectiv, timinei.

3.2. MUTAŢIILE INDUSE

Mutaţiile induse sunt determinate de agenţi mutageni externi sau interni, fizici sau chimici.

(1). *Factorii de mediu extern* precum radiaţiile ultraviolete (UV) – componentă a radiaţiei solare, radiaţiile ionizante şi numeroşi agenţi chimici genotoxici pot cauza diverse alterări în structura ADN (tabelul 6.3) care, lăsate nereparate, pot conduce la apariţia mutaţiilor. Pe primul loc ca frecvenţă în această categorie se află radiaţiile ultraviolete, ce produc dimeri pirimidinici. Din punctul de vedere al consecinţelor, fumul de ţigară este însă cel mai important agent mutagen exogen, acesta fiind responsabil de producerea mai multor decese prin cancer decât orice alt agent exogen cunoscut. Hidrocarburi policiclice se găsesc însă şi în produşii de combustie; lor li se adaugă agenţi alchilanţi/metilanţi ce poluează atmosfera, gudroanele de ulei, medicamente antitumorale, diverse minerale sau metale. Radiaţiile ionizante (X, gama) induc în special rupturi mono- sau bicatenare ale ADN. La om, radiaţiile ionizante - din surse naturale, profesionale, medicale sau accidentale - au probabil consecinţe genetice mici (caseta 6.4) (datorită eficacităţii mecanismelor de reparare a leziunilor) reprezentate cel mai adesea sub formă de mutaţii recesive, care se vor manifesta numai dacă se întâlnesc doi heterozigoţi cu o mutaţie identică. Organismele internaţionale au definit o limită arbitrară de siguranţă - mai mică decât cea care ar produce un efect semnificativ asupra frecvenţei mutaţiilor dăunătoare din populaţie - recomandând ca expunerea profesională să nu depăşească 50 mSv pe an .

CASETA 6.4

Radiaţiile ionizante

Radiaţiile ionizante includ unde electromagnetice cu lungime de undă foarte mică (razele gama şi razele-X) precum şi particule cu energie înaltă (particule alfa, beta şi neutroni). Razele-X, razele gama şi neutronii au mare putere de pătrundere comparativ cu particulele alfa şi beta (numai câţiva milimetri). Cantitatea de radiaţii primită pe ţesut iradiat se numeşte doză de radiaţii şi este măsurată în doză absorbită de radiaţii sau rad (radiation absorbed dose). *Oamenii pot fi expuşi la un amestec de radiaţii şi atunci se foloseşte o unitate convenţională* rem (roentgen equivalent for man) *pentru a măsura orice radiaţie în termeni de raze-X. Un rem de radiaţie este acea doză absorbită care produce într-un ţesut dat acelaţi efect biologic ca 1 rad de raze-X. Un milirem (mmrem) este a mia parte dintr-un rem.100 rem este echivalent cu* 1 sievert (Sv) *iar 100 razi este echivalent cu* 1 gray (Gy); *pentru practică, sievert şi gray sunt aproximativ egale.*

Potrivit unei concepţii mai vechi, bazată pe studii experimental, orice iradiere produce mutaţii (nu există prag sub care iradierea să nu aibe efect), numărul de mutaţii produse de radiaţii creşte proporţional cu doza, efectele genetice sunt cumulative. Studii recente par să infirme conceptul lipsei de prag, relevând că dozele mici stimulează activitatea mecanismelor reparării ADN.

Sursele de radiaţii la care este expus omul sunt naturale (radiaţii cosmice, materiale radioactive) şi artificiale (radiologie diagnostică sau terapeutică, expunere profesională, expunere accidentală) iar doza medie de radiaţii primită pe gonade, din diferite surse, este apreciată (Clarke şi Southwood, 1989) la 2,4 mSv pe an şi 72 mSv pentru 30 de ani (perioada reproductivă)[11].

La om efectele genetice ale radiaţiilor sunt greu de studiat deoarece ele nu sunt manifeste la generaţia expusă ci numai la generaţiile următoare şi aceasta în funcţie de tipul de mutaţie: dominant, recesiv sau legat de X. Studiile ample efectuate de către Neel şi Schull la supravieţuitorii bombardamentelor atomice din Japonia au arătat că nu există diferenţe semnificative ale nou-născuţilor morţi, malformaţiilor congenitale, deceselor neonatale, sex ratio (pentru mutaţii letale

[11] După alte evaluări, o persoană ce trăieşte într-o ţară dezvoltată primeşte circa 6-7 remi (1/3 din surse medicale) iar „doza de dublare” (valoarea de iradiere dincolo de care proporţia mutaţiilor se dublează) este de 30-80 remi per generaţie.

legate de X), cancere înainte de vârsta de 20 de ani - la urmaşii părinţilor expuşi (la o doză de 30-60 remi) comparativ cu descendenţii unui lot martor neexpus la radiaţii atomice. Rezultate similare au fost obţinute şi prin analiza efectelor iradierii medicale. În ceea ce priveşte iradierea profesională, mai ales în centralele nucleare, s-a descris o creştere semnificativă a numărului de copii cu leucemie din taţi ce lucrează în aceste unităţi, posibil prin inducerea de mutaţii în celulele lor germinale. Alte cercetări nu au reuşit, totuşi, să ateste efectele leucemogene ale iradierii paterne. Şi datele privind iradierea accidentală sunt contradictorii. Un studiu al persoanelor expuse la radiaţii după accidentul de la centrala nucleară de la Cernobîl indică o creştere de două ori a ratei mutaţiilor germinale. Dar este dificil să se compare aceste date cu rezultatele studiilor Japoneze deoarece tipul de radiaţii este oarecum diferit, lotul de la Cernobîl este mic (79 de familii) iar grupul martor era din populaţia britanică. În concluzie, încercările de a demonstra că radiaţiile produc alterări genetice la om nu au fost foarte convingătoare. Aceasta nu înseamnă că radiaţiile ionizante nu au consecinţe genetice ci numai ca acestea sunt probabil mici (mecanismele de reparare a leziunilor sunt destul de eficace) si cel mai adesea sub formă de mutaţii recesive, care se vor manifesta numai dacă se întâlnesc doi heterozigoţi cu o mutaţie identică.

Organismele internaţionale au definit o doză permisivă de radiaţii. Aceasta este o limită arbitrară de siguranţă şi este foarte probabil mai mică decât cea care ar produce un efect semnificativ asupra frecvenţei mutaţiilor dăunătoare din populaţie. S-a recomandat ca expunerea profesională să nu depăşească 50 mSv pe an, dar unele ţări au scăzut această doză la 15 mSv. Pentru a avea o imagine clară asupra acestei doze (prin comparaţie cu iradierea medicală sau cosmică) trebuie spus că 1 mSv este echivalentul dozei primite la 50 de radiografii toracice şi în 100 de zboruri de la Bucureşti la Paris. Cu toate acestea, este obligatoriu să se evite orice expunere nenecesară la radiaţii, în special pe gonade sau asupra fătului, şi să se asigure obligatoriu o protecţie maximă.

(2). Alte leziuni sunt produse de către diferite *agresiuni endogene* cum ar fi speciile reactive de oxigen (2-20.000 leziuni/genom/zi), o serie de molecule reactive mici (precum S-adenozil metionina: 600 leziuni/genom/zi) şi mai ales produşii de peroxidare ai lipidelor (malondialdehida, acroleina şi crotonaldehida care sunt metabolizate rapid către epoxizi şi pot genera apoi alterări ale bazelor ADN). Organismul poseda un sistem antioxidant (superoxid dismutaza, catalaza, glutation peroxidaza etc.) care încearcă să minimizeze aceste efecte. Atunci când capacitatea acestui sistem este depasită, aceşti agenţi induc modificări ale bazelor ADN şi rupturi monocatenare prin alterarea deoxiribozelor.

Tabelul 6.3 Tipuri de leziuni ADN şi agenţii etiologici ai acestora

Tipul de leziune ADN	Agentul etiologic
Erori de împerechere	Erori ale replicării
Situsuri abazice	Erori ale replicării, spontan
Deaminări	Spontan
Alchilări	Agenţi metilanţi (S-adenozil metionina)
Baze oxidate sau hidroxilate	UV-A, radicali ai oxigenului, radiaţii X, produşi ai peroxidării lipidelor
Dimeri pirimidinici	UV-B (> 320 nm)
Adiţia unor radicali chimici	Carcinogeni (atmosferici, alimentari, fum de ţigară), citostatice
Legături încrucişate intracatenare sau cu proteinele	Carcinogeni, citostatice
Legături încrucişate intercatenare	Mitomicina C, cisplatinul
Rupturi monocatenare	Radiaţii X, inhibitori ai topoizomerazei I, radicali ai oxigenului
Rupturi bicatenare	Radiaţii gama, inhibitori ai topoizomerazei II

3.3. FRECVENŢA MUTAŢIILOR GENICE.

Rata mutaţiilor unei gene se exprimă de obicei ca număr de mutaţii noi per locus per generaţie şi se evaluează prin determinarea incidenţei unor cazuri sporadice, noi, a unor boli autosomal dominante (cu penetranţă completă) sau recesive legate de X, care au o expresie clinică uşor de recunoscut (de exemplu, acondroplazia, aniridia, hemofilia, distrofia musculară Duchenne ş.a). Determinările pentru diferite afecţiuni au dat valori ale ratelor

mutaţiilor germinale cuprinse între 10^{-4} şi 10^{-7} mutaţii per locus / per generaţie, cu o frecvenţă medie de $1x10^{-6}$. Aceasta înseamnă că cel puţin una din 20 de persoane a primit de la unul din părinţi o genă mutantă nouă.

Mutaţiile noi se pot produce în spermatogeneză sau ovogeneză, în cursul diviziunilor mitotice sau meiotice ale celulelor germinale. Există însă diferenţe importante între cele două sexe privind *timpul de producere şi numărul de diviziuni celulare pe care le suferă celulele sexuale*.

> În ovogeneză, fiecare gamet este rezultatul a 22 de diviziuni mitotice şi unei diviziuni meiotice (23 de diviziuni) ce se produc în cursul vieţii fetale; după cum ştim deja (vezi capitolul 5.C.2) meioza I se opreşte înainte de naştere, rămâne astfel „suspendată" un timp îndelungat şi este reluată numai după ovulaţie. Cu cât ovocitele rămân mai multă vreme în meioza I (şi deci vârsta reproductivă maternă este mai mare) cu atât mai mult creşte riscul nedisjuncţiei meiotice. În spermatogeneză, producţia de gameţi se face până la vârste avansate şi fiecare spermatozoid rezultă, în medie, după 200 de diviziuni iar acest număr creşte cu vârsta. Explicaţie: spermatogoniile susă se formează până la pubertate, prin circa 30 de mitoze; apoi sunt necesare 5 diviziuni pentru fiecare ciclu de spermiogeneză, care durează 16 zile (deci 23 cicluri pe an); numărul de diviziuni pentru formarea unui spermatozoid se calculează după formula următoare: 30+23**n**+5, în care **n**= vârsta în ani–15 (vârsta pubertăţii). La o frecvenţă de 10^{-10} erori de replicare per genom per diviziune fiecare spermatozoid al adultului va conţine câteva sute de mutaţii noi produse prin acest mecanism. Deşi marea lor majoritate nu vor avea efecte fenotipice aparente se estimează că o mică proporţie de spermatozoizi (circa 1 din 10) vor avea o mutaţie patogenă.

Rezultă, logic, că frecvenţa neomutaţiilor paterne produse prin erori de replicare a ADN ar trebui să fie mai mare decât a neomutaţiilor materne şi să crească odată cu vârsta tatălui, fapt observat în anumite boli, ca *neurofibromatoza, acondroplazia sau hemofilia B* (la bunicul matern al bolnavului). Acest fenomen este amplificat de faptul că metilarea citozinei în dimerul CpG este mai frecventă în celulele germinale masculine, determinând transversiile de tip C→T sau G→A.

> Astfel, mutaţiile FGFR2 (receptorul factorului de creştere fibroblastică de tip 2) – responsabile de *sindromul Apert* (o craniostenoză asociată cu polisindactilie) – sunt toate de origine paternă. Mai mult, unele remanieri genice (inversia genei ce codifică factorul VII al coagulării sau deleţia/duplicaţia genei PMP22, discutate mai sus) se produc, din motive necunoscute, exclusiv în celulele germinale masculine.

Diferenţele de sex în producerea unor mutaţii se observă pregnant şi în unele boli prin expansiunea repetiţiilor trinucleotidice. Astfel, expansiunea amplă a repetiţiei CAG, ce produce formele juvenile de boală Huntingon, este în general de origine paternă. Dar expansiunea masivă a repetiţiei CGG în sindromul X fragil se produce aproape întotdeauna în timpul gametogenezei feminine. Aceste diferenţe pot exprima nu numai diferenţele fundamentale dintre ovogenză şi spermatogeneză ci şi o selecţie contra gameţilor ce poartă expansiunea repetiţiei.

Multe mutaţii se produc, firesc, şi în *celulele somatice* care efectuează un număr mare de replicări şi diviziuni. Un organism uman adult are circa 10^{14} celule derivate din zigot prin 10^{15} diviziuni celulare; la o frecvenţă de 10^{-10} erori de replicare per genom şi per diviziune rezultă mii de mutaţii noi în genomul fiecărei celule. Dar consecinţele lor fenotipice depind de natura mutaţiei, gena alterată şi ţesutul implicat. Ele se întâlnesc frecvent în procesul de cancerogeneză şi constituie, foarte probabil, una din cauzele heterogenităţii expresiei clinică a unor boli ereditare. Mozaicurile somatice ar putea produce boli genetice numai dacă se produc precoce, în cursul dezvoltării embrionare. Cert este că mutaţiile somatice (non germinale) nu se transmit generaţiilor viitoare.

4. MECANISMELE REPARĂRII LEZIUNILOR ADN.

Genomul uman suferă numeroase şi variate leziuni – spontane sau induse de agenţi externi sau interni. Totuşi rata mutaţiilor este menţinută la un nivel scăzut prin intervenţia unor *sisteme de recunoaştere a leziunilor ADN şi reparare enzimatică*, care realizează fie o restituţie fidelă a structurii iniţiale fie o reparare parţială, cu defect. Acţiunea acestor sisteme este corelată cu mecanismele care coordonează progresia prin ciclul celular, tolerarea unor leziuni sau apoptoza. Nici unul dintre mecanismele de reparare ale ADN nu are o eficienţă

absolută dar, în general, performanţa lor este ridicată. Existenţa unor boli umane asociate cu *defecte în repararea ADN*, multe din ele având o creştere a susceptibilităţii la cancer, demonstrează importanţa acestui proces de "control al calităţii ADN".

4.1. MECANISMELE DE REPARARE ALE ADN NUCLEAR .

a). Repararea erorilor de împerechere din cursul replicării ADN.

În momentul în care cele două catene ADN sunt separate, nucleotidele activate se aranjează "spontan" şi pe bază de complementaritate pe întreaga porţiune a matriţei de ADN astfel expusă. Stoichiometria reacţiei de poziţionare pe bază de complementaritate permite împerecheri greşite (în special G-T) cu o probabilitate de 1 la 10.000. În plus, replicarea secvenţelor repetitive ale ADN se însoţeşte relativ frecvent de fenomenul de "alunecare (glisare)" (*slippage*) a ADN-polimerazei, ceea ce conduce la formarea unor bucle de către una din catene cu alungirea (inserţie) sau scurtarea (deleţia) secvenţei repetitive (vezi figura 6.8). Rata mutaţiilor este, însă, mult mai mică datorită intervenţiei unor mecanisme care asigură fidelitatea replicării şi păstrarea informaţiei ereditare.

Un prim mecanism implică ADN polimerazele care nu catalizează încorporarea pasivă a oricărui nucleotid care este deja legat prin punţi de hidrogen la catena matriţă, ci discriminează activ împotriva unor împerecheri greşite, acestea producând distorsiuni a dublului-helix ADN. *Distorsiunile acţionează ca semnal pentru îndepărtare bazei inserate greşit*. Mecansimul creşte acurateţea replicării de aproximativ 100 de ori, reducând rata aşteptată a erorilor de la 10^{-4} la aproximativ 10^{-6}.

Un alt mecanism major răspunzător pentru acurateţea replicării ADN este activitatea de *autocorecţie* (sau editare de la *proofreading*) a ADN polimerazelor. Ca un veritabil "editor", ADN polimerazele *verifică dacă ultimul nucleotid* plasat la capătul 3'OH al catenei de ADN este "scris corect", deci dacă nu există o greşeală de împerechere. In cazul unei astfel de erori ele pot să-l excizeze (datorită capacităţii exonucleazice 3' – 5' pe care o posedă) şi să-l înlocuiască cu nucleotidul corespunzător. O astfel de activitate, demonstrată pentru ADN polimerazele delta si epsilon, permite creşterea acurateţei replicării ADN de circa 100-1000 ori.

În sfârşit, puţinele erori de împerechere care apar totuşi în ciuda intervenţiei mecanismelor mai sus amintite vor fi ţinta unor mecanisme de **reparare a erorilor de împerechere** (MMR de la *mismatch repair*) ce intervin după replicare.

Sistemul MMR a fost descris iniţial la E.coli cu fenotipul *mutator (mut)*, ce determină o creştere a ratei mutaţiilor spontane pentru toţi locii din genomul bacteriei. Sistemul implică intervenţia unor proteine speciale (proteine mutator): *Mut S, Mut L şi Mut H* – ce formează aşa numitul sistem de reparare "direcţionat metil". Denumirea derivă de la mecanismul de *identificarea a catenei* care conţine nucleotidul împerecheat greşit. Această funcţie pare a fi asigurată de diferenţa în statusul de metilare care există între catena nou sintetizată (nemetilată)[12] şi catena matriţă (metilată). În esenţă, împerecherea greşită produce o *distorsiune* a catenei nou sintetizate, nemetilată, *recunoscută* de proteina Mut S care se fixează la catenă şi „recrutează" proteinele Mut L (care stabilizează complexul), Mut H (cu acţiune endonucleazică) şi o helicază (Mut U, care desface duplexul ADN). Mut H va *cliva* catena de ADN şi fragmentul de circa 100 pb va fi *îndepărtat* de o exonuclează. Golul rezultat va fi *reparat* de către ADN polimeraza, folosind secvenţa de baze a matriţei. Pasul final este realizarea *legăturii* fosfodiester de către ADN ligază.

La om au fost identificate genele care codifică proteinele *MSH 2, MSH3* şi *GTBP (sau MSH6)* – omologe cu Mut S – precum şi proteinele *MLH1, PMS1* şi *PMS2* – omologe cu Mut L. Nucleotidele împerecheate greşit sunt identificate prin intermediul a două complexe: MSH2/MSH6 (GTBP) care recunosc în special erorile de împerechere şi MSH2/MSH3 care

[12] Metilarea este un proces postreplicativ şi catena nou sintetizată nu este imediat metilată.

recunosc preferenţial micile inserţii/deleţii. După recunoaşterea erorii de împerechere, intervin complexele heterodimerice MLH1/PMS2 şi MLH1/PMS1 ce interacţionează cu complexele legate anterior (figura 6.18). În continuare, procesul de reparare presupune secţionarea şi degradarea exonucleazică a unui fragment ADN cu o lungime de peste 1-2 kb (ce conţine erorile de replicare), urmată de refacerea secvenţei normale. Pentru aceste acţiuni, mecanismul de reparare utilizează o serie de factori comuni altor sisteme de reparare (ADN-polimeraza δ, RPA, PCNA, factorul de replicare C (RFC), exonucleaza 1, FEN1 şi exonucleazele asociate ADN-polimerazelor δ şi ε).

Mutaţiile genelor implicate în calea MMR au drept consecinţă o boală genetică, relativ frecventă, numită *cancerul colorectal nonpolipozic ereditar* (HNPCC), responsabilă de apariţia a circa 5% din toate cazurile de cancer colorectal; boala se asociază un risc relativ crescut pentru dezvoltarea unor neoplazii maligne cu alte localizări.

Există câteva caracteristici ale neoplasmelor colorectale care apar în cadrul HNPCC: 70% sunt localizate proximal de flexura splenică, există un exces de cancere mucinoase sau cu infiltraţie limfocitară iar evoluţia pare a fi mai bună. Markerul principal al celulelor cu HNPCC este *instabilitatea microsateliţilor* (secvenţe di-, tri- sau tetranucleotidice înalt repetitive, dispersate în genom). Circa 60-70% din cazurile de HNPCC sunt determinate de mutaţii ale genelor MLH1 şi MSH2; un număr redus de cazuri sunt asociate cu mutaţii ale genelor PMS1, PMS2 şi MSH6.

b). Repararea bazelor modificate sau alterate după replicare

În afara erorilor ce se produc în timpul replicării, o altă sursă de mutaţii este modificarea chimică sau alterarea bazelor azotate după replicare. Leziunile ADN produse de agenţi endogeni sunt îndepărtate de obicei prin mecanismul de *excizie a bazelor* (BER) modificate şi mai rar prin *reparare directă* monoenzimatică (MGMT). Agenţii mutageni exogeni care produc distorsiunea dublului helix prin legături încrucişate intra- sau intercatenare; aceste alterări sunt îndepărtate prin *excizia nucleotidelor* (NER).

Mecanismele BER, NER şi chiar a MMR sunt variante ale unui mecanism general de **reparare prin excizie-resinteză**, ce diferă prin ţinta lor, modul de recunoaştere a leziunii şi moleculele efectoare. Acest mecanism se realizează în mai multe etape (figura 6.19):

- recunoaşterea situsului lezat (bază sau nucleotid), prin acţiunea unor *enzime specifice*;
- desfacerea dublului helix, de către o *helicază*;
- excizia fragmentului de ADN alterat şi a unui segment învecinat leziunii, prin intervenţia unor endonucleaze;
- îndepărtarea şi degradarea fragmnetului, de către *exonucleaze*;
- resinteza componentelor breşei/lacunei (folosind ca matriţă catena de ADN complementară) prin acţiunea unor *ADN polimeraze*;
- realizarea, de către o *ADN ligază,* a legăturii fosfodiester între fragmentul de ADN neosintetizat şi capetele libere ale catenei de ADN.

(1). **Repararea prin excizia bazei** (*base excision repair- BER*). O bază modificată chimic (frecvent prin dezaminare spontană) este *îndepărtată* prin intermediul unor *ADN-glicozilaze*[13] care clivează legătura glicozil dintre baza azotată şi deoxiriboză. Se creează astfel un *situs abazic* care este recunoscut de către *endonucleaza APE1* (apurinic/ apyrimidinic endonuclease 1), enzimă cu rol cheie în calea de reparare BER la om; această enzimă clivează catena ADN pe flancul 5' al situsului abazic. Apoi intervine *polimeraza β* (figura 6.20) care îndepărtează reziduul 5'-deoxiribozo-fosfat (dRp), inseră nucleotidul corespunzător catenei matriţă şi recrutează complexul *ligază 3* – XRCC1, care va reface continuitatea catenei.

În unele cazuri reziduul 5'-deoxiribozofosfat rezistă la acţiunea polimerazei β, fiind necesară o cale alternativă, cu intervenţia polimerazei δ şi îndepărtarea a 2 – 13 nucleotide ("long-patch BER"). În această cale alternativă, minoră la om, intervine şi PCNA (antigenul nuclear al celulelor proliferante) şi nucleaza FEN1 care împiedică formarea unor structuri secundare de către porţiunile ADN monocatenare apărute intermediar. Continuitatea catenei va fi restabilită de această dată de către ligaza 1.

(2). Repararea directă monoenzimatică (*MGMT*). Prin intervenţia unor cataboliţi celulari reactivi se formează O^6-metilguanina. În acest caz se produce o reparare directă, prin

[13] Cea mai abundentă dintre ADN-glicozilaze este *uracil ADN-glicozilaza* (UNG) care produce îndepărtarea reziduurilor de uracil ce rezultă prin dezaminarea citozinei.

intervenţia enzimei *metilguanin metil transferaza* (MGMT); aceasta transferă gruparea metil de la nivelul O^6-metilguaninei pe un reziduu propriu de cisteină (figura 6.21) formând 5-metilcisteina, o moleculă foarte stabilă, care inactivează enzima. Repararea sacrifică în întregime o moleculă proteică pentru fiecare leziune corectată. De aceea, acest mecanism de reparare este foarte rapid saturat atunci când organismul este supus unor agenţi alchilanţi exogeni.

(3). Repararea prin excizia nucleotidelor (*nucleotid excision repair – NER*). Calea de reparare NER este utilizată pentru corectarea a diferite tipuri de leziuni ADN asociate cu *distorsiunea* structurii dublu-helicoidale, precum dimerii de pirimidină produşi de radiaţiile UV sau modificările chimice determinate de benzpiren, aflatoxină şi cisplatin. Acest sistem de reparare este complex şi implică un număr mare de proteine şi gene.

Aceste gene au fost identificate la pacienţi cu diferite mutaţii ce produc trei afecţiuni rare: *xeroderma pigmentosum* (XP), *sindromul Cockayne* (CS) şi o formă cu fotosensibilitate a *trichotiodistrofiei* (TTD). Trăsătura comună este sensibilitatea foarte accentuată la expunerea solară ca urmare a reparării deficitare a leziunilor ADN induse de radiaţiile UV; în schimb, celelalte manifestări clinice sunt extrem de diferite. Pacienţii cu **XP** prezintă o creştere foarte accentuată, de peste 2000 de ori, a riscului pentru apariţia unui cancer cutanat şi, în multe cazuri, o neurodegenerare accelerată. Pacienţii cu **CS** prezintă anomalii neurologice degenerative progresive foarte severe şi manifestări de îmbătrânire precoce. **TTD** este caracterizată prin aspectul fragil al părului şi unghiilor, precum şi unele trăsături prezente şi în CS. Heterogenitatea clinică este consecinţă heterogenităţii genetice. Pentru XP sunt identificate 7 gene (XPA – XPG). În cazul CS sunt implicate 5 gene: CSA, CSB şi alele specifice ale XPB, XPD şi XPG. TTD varianta cu fotosensibilitate este determinată de mutaţia a 3 gene: din nou XPB şi XPD, precum şi TTDA.

Mecanismul prin care este *recunoscută leziunea ADN* este o problemă încă mult discutată. În prima etapă intervine un complex specific (XPC-hHR23B) care recunoaşte distorsiunea ADN produsă de agenţii mutageni şi *localizează* catena lezată. A doua etapă implică întreruperea activităţii helicazelor (XPB şi XPD din structura TFIIH) şi, în cazul particular al leziunilor induse de radiaţiile UV, fixarea la acest nivel a unui factor specific (UV-DDB, alcătuit din subunităţile p125 şi p48). Următoarea etapă în calea NER este formarea la nivelul leziunii a unui macroagregat proteic necesar pentru *incizia dublă a catenei* care conţine leziunea. După *îndepărtarea* unui fragment de 24-32 de nucleotide care conţine leziunea, are loc *resinteza ADN,* prin intermediul ADN polimerazei δ sau ε, şi *legarea capetelor,* prin intermediul ligazei 1 (figura 6.22).

Modelul descris mai sus este utilizat pentru repararea ADN-ului netranscris, majoritar în genom. În cazul special al genelor transcrise, leziunile care impiedica activitatea de elongare realizată de ARN polimeraza II în cursul transcriptiei sunt reparate printr-un sistem cuplat cu transcriptia (*transcription-coupled repair* - TCR). Corectarea este realizată de 5-10 ori mai rapid, cu participarea aceloraşi factori utilizaţi pentru ADN-ul netranscris (cu excepţia XPC). Semnalul de recunoaştere a leziunii este blocarea progresiei ARN polimerazei II. În plus, intervin şi proteinele CSA şi CSB (implicate în sindromul Cockayne), care au rolul de a cupla activitatea ARN polimerazei II cu mecanismul de reparare.

c). Repararea rupturilor ADN

Rupturile monocatenare ale ADN sunt produse de speciile reactive de oxigen şi reparate prin intermediul enzimelor responsabile de ultimele etape ale mecanismului BER.

Rupturile bicatenare ale ADN, mai rare decât cele monocatenare, pot apărea fie spontan (în cursul replicării, recombinării meiotice sau recombinării somatice VDJ, ce are loc în sinteza imunoglobulinelor), fie ca urmare a expunerii la radiaţiile ionizante. Repararea rupturilor bicatenare este un proces complex care se realizează în mai multe etape. Prima etapă constă în *sesizarea* prezenţei unei rupturi ADN bicatenare, prin intervenţia probabilă a unui complex multiproteic numit BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*)[14]. Următoarea etapă este una de *semnalizare*, care implică activitatea a două kinaze înrudite: ATM şi ATR. Acestea produc *activarea* unor proteine importante pentru repararea propriu-zisă (NBS1 sau BRCA1) sau blocarea ciclului celular, la nivelul punctului de control G2/M (prin intermediul proteinelor MDM2 şi P53). După aceste etape comune, celula alege unul din mecanismele alternative de reparare: recombinare omologă sau unirea neomologă a capetelor.

[14] Complexul BASC conţine proteinele BRCA1, ATM, complexul NBS1-MRE11-RAD50, proteinele MSH2/MSH6 şi MLH1 care intervin şi în calea MMR şi helicaza BLM .

- **Recombinarea omologă** (*homologous recombination* – HR) este mecanismul cel mai frecvent utilizat la om şi este un mecanism de reparare precis, care utilizează pentru reparare o catenă de ADN intactă de pe cromatida soră sau de pe cromosomul omolog;

  Recombinarea omologă debutează prin procesarea iniţială a capetelor rupte de către complexul NBS1-MRE11-RAD50 (activat de către proteina ATM) care va conduce la formarea unor capete 3' monocatenare (figura 6.23). RAD52 se ataşează la capetele monocatenare astfel formate şi le protejează. Apoi, ADN-ul intact de la nivelul cromatidei soră sau a cromosomului omolog este utilizat ca matriţă pentru a înlocui informaţia genetică în cursul procesului nucleolitic. În final intervine o etapă de ligare care completează acest mecanism de reparare a ADN.

- **Unirea neomologă a capetelor** (*non-homologous end-joining* – NHEJ) un mecanism predispus la erori (mici inserţii sau deleţii), în care capetele rupte ale ADN sunt unite fără nici o omologie, ori cu ajutorul unor secvenţe omologe scurte (< 10 pb).

  Unirea neomologă a capetelor rupte debutează prin legarea heterodimerului KU70/KU80 la nivelul capetelor ADN care activează apoi o protein kinază ADN-dependentă. Intervine, de asemenea, complexul NBS1-MRE11-RAD50 care are atât activitate enzimatică cât şi structurală. Una dintre activităţile importante ale proteinei NBS pe această cale este activarea recombinazelor RAG1 şi RAG2 (care intervin în procesul de recombinare VDJ din cursul sintezei imunoglobulinelor). Complexul XRCC4/ligază 4 este necesar pentru unirea capetelor rupte. Repararea poate fi în acest caz fie precisă, fie cu pierderea sau adiţia unor nucleotide ceea ce conduce la o mutaţie.

Mutaţiile genelor care codifică proteine ce intervin în repararea rupturilor ADN pot determina numeroase boli: ataxia telangiectazia, sindromul Nijmegen, sindromul Bloom, anemia Fanconi, cancerul de sân ereditar. Majoritatea lor implică mutaţii ale proteinelor ce intervin în calea HR şi au transmitere recesivă, deşi există şi exemple de boli cu transmitere dominantă.

- *Ataxia telangiectazia* (AT) este o afecţiune rară (circa 1 la 100.000 locuitori), care se manifestă clinic prin ataxie (datorită unei degenerări neuronale progresive), prezenţa telangiectaziilor vizibile în special la nivelul conjunctivei bulbare, radiosensibilitate, imunodeficienţă şi un risc crescut pentru apariţia cancerelor, mai ales a limfoamelor. Heterozigoţii (circa 1% din populaţie) au un risc crescut pentru cancerul de sân. Boala este determinată de mutaţia genei ATM (cromosomul 11q22) care codifică o protein kinază ce activează numeroase proteine implicate în căile de reparare ale rupturilor ADN sau în punctul de control G2/M a ciclului celular.
- *Cancerul de sân ereditar* este una dintre cele mai frecvente boli genetice (circa 1 la 800 de indivizi) caracterizată printr-un risc crescut de apariţie a unui neoplasm mamar (36-85%), precum şi pentru cancerul de ovar (16-60%). Debutul bolii este adeseori precoce şi uneori bilateral. Au fost identificate două gene: BRCA1 (17q21) şi BRCA2 (13q12) ce codifică proteine care interacţionează cu RAD51 în calea de reparare HR a rupturilor ADN bicatenare (13).

4.2. REPARAREA LEZIUNILOR LA NIVELUL ADN MITOCONDRIAL.

Absenţa histonelor cu rol protector şi mediul foarte bogat în specii reactive de oxigen rezultate în cursul sintezei ATP fac ca ADN-ul mitocondrial să fie mult mai susceptibil la anumite tipuri de leziuni comparativ cu ADN-ul nuclear. În prezent se cunoaşte că la nivelul acestor organite funcţionează unele mecanisme de reparare prezente şi la nivel nuclear, în timp ce altele sunt absente. Astfel, mitocondriile prezintă capacitatea de reparare a O^6 metilguaninei prin intermediul enzimei MGMT. De asemenea, au fost identificate numeroase componente care intervin în mecanismul BER, precum unele ADN glicozilaze, endonucleaza APE1 etc. În schimb, mecanismul NER este absent. Rata mutaţiilor care persistă în urma intervenţiei acestor mecanisme de reparare este considerată a fi de 10 ori mai mare decât în cazul genomului nuclear şi aceasta contribuie la procesul de îmbătrânire şi la apariţia unor boli degenerative.

4.3. TOLERAREA LEZIUNILOR ADN

În punctele de control ale ciclului celular sunt declanşate mecanismele care blochează progresia celulelor cu leziuni ale ADN pentru a permite repararea lor înaintea replicării. Dar aceasta viziune este o suprasimplificare deoarece în prezent devine tot mai clar faptul că, în anumite condiţii (de exemplu, „saturarea" mecanismelor de replicare datorită leziunilor prea

numeroase) celulele pot tolera unele dintre leziunile ADN, fără a le corecta. Când ajung în dreptul leziunii catenei matriță, ADN polimerazele sunt confruntate cu următoarea alternativă:

- inseră la întâmplare un nucleotid şi depăşesc astfel „punctul critic", replicând restul ADN din replicon; celula supravieţuieşte dar leziunea ADN persistă; efectul va depinde de localizarea leziunii în genom;
- lasă o breşă în catena nou sintetizată şi reiau replicarea în aval de locul leziunii; lacuna produsă poate fi uneori rezolvată ulterior (prin intervenţia unui sistem enzimatic de recombinare postreplicativă).

Prin ambele alternative se poate corecta leziunea sau se produce o reparare infidelă, cu defect.

C. ANOMALIILE CROMOSOMICE

Anomaiile cromosomice pot fi definite ca fiind modificări produse de o alterare *vizibilă* a cromosomilor. Evidenţierea acestor modificări depinde de tehnica de studiu folosită. Dacă rezoluţia maximă a metodelor tradiţionale este de circa 4 megabaze, tehnicile de citogenetică moleculară permit observarea unor leziuni cu mult mai mici, ceea ce face dificilă delimitarea clară între anomalii cromosomice şi mutaţiile genice masive (macroleziuni). În aceste condiţii, anomaliile cromosomice se definesc ca modificări genetice produse prin *mecanisme cromosomice specifice:* segregarea anormală a cromosomilor în meioză sau mitoză, recombinare intercromosomică aberantă sau reparare greşită a rupturilor cromosomice.

Cele mai multe dintre anomaliile cromosomice produc un dezechilibru genetic care determină anomalii fenotipice diverse (întârziere de creştere şi dezvoltare, anomalii congenitale multiple, retard mintal, tulburări de sexualizare şi reproducere, unele forme de cancere, ş.a) şi cu gravitate diferită. Dacă la aceste consecinţe clinice variate şi semnificative, prezente în numeroase specialităţi medicale, adăugăm şi frecvenţa mare a anomaliilor cromosomice (≥ 8% din sarcinile recunoscute clinic, 0,7-1% nou născuţii vii) atunci obţinem argumente solide pentru a aprecia ca patologia cromosomică este o problemă majoră de sănătate publică.

1. TIPURILE ŞI MECANISMELE DE PRODUCERE ALE ANOMALIILOR CROMOSOMICE.

1.1 CLASIFICAREA ANOMALIILOR CROMOSOMICE

Anomaliile cromosomice pot fi clasificate în raport cu mai multe criterii (tabelul 6.4).

După momentul producerii lor, anomaliile cromosomice se împart în: **anomalii constituţionale şi anomalii dobândite**. Anomaliile constituţionale sunt prezente la naştere şi au originea în cursul gametogenezei unuia dintre părinţi sau în primele etape ale embriogenezei. Anomaliile dobândite apar ulterior în cursul vieţii, sub forma unor clone celulare anormale.

Tabelul 6.4 Clasificarea anomaliilor cromosomice

Criteriu	Tip de anomalie
momentul apariţiei	constituţionale dobândite
modul de afectare al materialului genetic	numerice - poliploidii - aneuploidii structurale - echilibrate - neechilibrate disomii

	uniparentale
numărul de celule afectate	omogene în mozaic
tipul de cromosom afectat	autosomale gonosomale
tipul de celule afectate	somatice germinale

În raport cu modul de afectare al materialului cromosomic anomaliile pot fi împărţite în: **numerice, structurale şi funcţionale**.

- **Anomaliile cromosomice numerice** sunt modificări ale numărului de cromosomi în raport cu numărul normal diploid de 2n = 46 de cromosomi. Anomaliile numerice se clasifică în: *poliploidii şi aneuploidii*. Poliploidiile reprezintă prezenţa în plus a unuia sau mai multor seturi haploide complete de cromosomi. Aneuploidiile se caracterizează prin prezenţa în plus sau absenţa unuia sau mai multor cromosomi.
- **Anomaliile cromosomice structurale** se caracterizează prin modificarea structurii normale a cromosomilor. Ele se împart, în raport cu efectul fenotipic, în: *anomalii echilibrate şi anomalii neechilibrate.* Anomaliile cromosomice structurale echilibrate (translocaţii şi inversii) sunt caracterizate printr-o modificare a poziţiei unuia sau mai multor segmente cromosomice, fără afectarea cantităţii totale de material genetic şi, implicit, fără afectarea fenotipului (în marea majoritate a cazurilor). Anomaliile cromosomice structurale neechilibrate (deleţii, duplicaţii, cromosomi inelari, cromosomi dicentrici şi isocromosomi) sunt caracterizate prin prezenţa suplimentară (trisomie parţială) sau absenţa (monosomie parţială) unor părţi din cromosom sau asocierea dintre surplusul şi lipsa unuia sau mai multor segmente cromosomice.
- **Anomaliile cromosomice funcţionale** sunt reprezentate de *disomia uniparentală*, caracterizată prin prezenţa la acelaşi individ a unei perechi de cromosomi ce provine de la acelaşi genitor.

În raport cu numărul de celule afectate, anomaliile cromosomice pot fi împărţite în: **omogene şi în mozaic**. Anomaliile omogene se caracterizează prin prezenţa anomaliei în toate celulele individului afectat. Anomaliile în mozaic sunt caracterizate de prezenţa a două sau mai multe linii celulare care diferă prin numărul de cromosomi, dar derivă din acelaşi zigot.

În funcţie de tipul de cromosom afectat, anomaliile cromosomice se clasifică în: **anomalii autosomale** (sunt interesaţi unul sau mai mulţi autosomi) **anomalii gonosomale** (anomalia implică cromosomii X sau Y) şi **anomalii mixte** (când sunt implicaţi cel puţin un autosom şi un gonosom).

În raport cu tipul celulei afectate, anomaliile cromosomice se clasifică în: **anomalii somatice** (modifică fenotipul individului afectat) şi **anomalii germinale** (anomalia nu modifică fenotipul pacientului, dar se poate transmite prin gameţi la descendenţi).

Pentru nomenclatura tuturor acestor tipuri de anomalii cromosomice se foloseşte un sistem standardizat, elaborat de participanţii la diferite conferinţe internaţionale (ISCN[15], Paris, 1995; vezi tabelul 2.6 şi capitolul 2.D.3.3).

1.2. ANOMALIILE CROMOSOMICE NUMERICE

Numărul de cromosomi al speciei umane este de 46. Celulele somatice normale sunt *diploide* (*2n*=46 cromosomi) în timp ce celulele sexuale mature normale – ovulul şi spermatozoidul – sunt *haploide* (*n*=23 cromosomi). Anomaliile numărului de cromosomi se împart în două categorii: poliploidii şi aneuploidii; acestea pot fi omogene sau în mozaic[16].

[15] ISCN-*(International System of Chromosomal Nomenclature)* – Sistemul Internaţional de Nomenclatură a Cromosomilor

[16] Unii autori împart anomaliile de număr în poliploidii, aneuploidii şi mixoploidii (mozaicuri şi himere).

Este util de precizat că orice multiplu *exact* a lui ***n*** este numit **euploidie**; constituţia cromosomică euploidă (*n, 2n, 3n, 4n*) nu este obligatoriu normală. Termenul de **aneuploidie** se referă la orice situaţie în care numărul de cromosomi *nu este euploid*, fie că un cromosom este în plus sau lipseşte

a). Poliploidiile

Poliploidiile se caracterizează prin prezenţa în plus a unuia sau mai multor seturi haploide (n=23) de cromosomi. Singurele poliploidii identificate la om sunt: **triploidia** (3n=69 cromosomi) şi **tetraploidia** (4n=92 cromosomi). Cauza cea mai frecventă a triploidiei este *dispermia* (fecundarea unui ovul de către doi spermatozoizi; mai rar, triploidia poate rezulta prin fertilizarea unui gamet normal (n) de către un gamet diploid (2n): spermatozoid (diandrie) sau ovul (diginie). Tetraploidia se produce de obicei printr-o eroare în prima diviziune a zigotului: ADN a fost replicat şi cantitatea totală devine 4C, dar nu are loc diviziunea.

Poliploidiile se caracterizează prin modificări importante ale cantităţii de material genetic, care produc modificări majore ale fenotipului, de obicei cu efect letal; acest fapt determină pierderea foarte precoce, în primele săptămâni de sarcină, a produsului de concepţie poliploid. Astfel, triploidiile se întâlnesc la 1-3% din sarcinile recunoscute clinic dar marea majoritate a embrionilor sunt eliminaţi (15-20% din avorturile spontane cu anomalii cromosomice); triploidia (deobicei sub formă de mozaic 3n/2n) se găseşte numai la 1 din 10.000 de nou-născuţii vii, care, evident, nu supravieţuiesc.

Deşi poliploidiile omogene au efecte foarte grave, în unele ţesuturi umane pot fi întâlnite în mod normal celule poliploide. Astfel, în ficat celulele implicate în regenerarea hepatică sunt tetraploide, în timp ce în măduva osoasă hematogenă există megacariociote octaploide sau chiar cu 16 seturi haploide de cromosomi.

b). Aneuploidiile

Aneuploidia reprezintă o anomalie cromosomică[17] produsă fie prin pierderea unui cromosom (*monosomie*), fie prin prezenţa în exces a unui cromosom (*trisomie*), mai rar a doi cromosomi (*tetrasomie*); ele pot interesa autosomii sau cromosomii sexuali.

- *Monosomiile* sunt anomalii caracterizate prin prezenţa într-o celulă somatică a unui singur cromosom, în locul unei perechi de cromosomi (2n-1). Monosomiile autosomale au fost descrise numai la embrioni şi, fără excepţie, monosomiile autosomale complete sunt letale. Singura monosomie compatibilă cu viaţa la om este monosomia X.
- *Trisomiile* se caracterizează prin prezenţa într-o celulă somatică a trei exemplare ale aceluiaşi cromosom, în locul perechii normale de cromosomi omologi (2n+1). La specia umană majoritatea trisomiilor complete sunt letale, ducând la avorturi spontane precoce. Singurele excepţii sunt trisomiile autosomale: 21, 18, 13, 8 (dar numai în mozaic), şi cele gonosomale (XXX, XXY şi XYY).
- În cazul anomaliilor gonosomilor sunt posibile şi *tetrasomii* (48,XXXX, 48,XXYY, 48,XXXY) sau chiar *pentasomii* (49,XXXXX, 49,XXXXY). Au fost descrise însă tetrasomii parţiale: 9p, 12p, 18p, 21q

Aneuploidiile omogene sunt consecinţa unor erori produse în cursul meiozei: nedisjuncţia cromosomică în meioza I, nedisjuncţia cromatidiană în meioza II şi întârzierea (pierdere) anafazică (vezi capitolul 5.C.3.1.b). *Nedisjuncţia în meioză* produce gameţi anormali – cu 24 de cromosomi (disomici) sau cu 22 de cromosomi (nulisomici) – care după unirea cu un gamet normal formează zigoţi trisomici sau nulisomici (vezi figura 5.20). Despre nedisjuncţie am discutat pe larg în capitolul 5.C.1.3 (vezi şi caseta 5.3); vom reaminti numai că nedisjuncţia meiotică este frecventă (circa 8% din toate sarcinile recunoscute clinic) şi se produce mai ales în ovogeneză, în special în meioza I. Totuşi, nedisjuncţia meiotică paternă este frecventă (70%) în monosomia X şi 100% în trisomia XYY. *Întârzierea anafazică* este un accident care se poate produce în anafazele ambelor meioze (mai frecvent în anafaza II) şi constă în blocarea migrării sau reducerea vitezei de migrare a unui cromosom (cromatidă)

[17] Celulele normale sunt *disomice* pentru fiecare autosom şi cromosomul X la femeie.

urmată de pierderea sa din nucleu. Rezultă gameţi nulisomici, care prin fertilizare cu gameţi normali vor produce zigoţi cu monosomie.

Aneuploidiile în mozaic sunt de obicei consecinţa unor erori ale mitozei: nedisjuncţia cromatidiană (care va determina mozaicuri cromosomice de tipul 47/45 sau 47/46/45) şi întârzierea anafazică (produce mozaicuri 46/45 dar numai la cromosomii sexuali - 46,XX/45,X sau 46,XY/45,X - deoarece implicarea unui alt cromosom duce la apariţia de celule monosomice neviabile. Un alt posibil mecanism pentru formarea mozaicurilor cromosomice numerice îl reprezintă "corecţia sau salvarea" unei trisomii omogene la zigot. Deoarece, trisomiile sunt anomalii grave, organismul încearcă corectarea acestora prin pierderea cromosomului suplimentar. În condiţiile în care acest mecanism acţionează doar în unele celule, va rezulta un mozaic de tipul 2n+1/2n (47/46)[18].

De multe ori, în aceste cazuri, **mozaicul este limitat la nivelul placentei** (*confined placental mosaicism*) embrionul fiind normal. De regulă un astfel de mozaic este consecinţa unui mecanism de salvare al unei trisomii iniţiale şi poate conduce la apariţia unei disomii uniparentale (vezi secţiunea 1.4). Într-o astfel de situaţie, este foarte dificilă alegerea unei opţiuni referitoare la finalizarea sarcinii, deoarece pe de o parte prezenţa unei placente anormale determină tulburări ale creşterii embrionare şi fetale, iar pe de altă parte există riscul ca viitorul copil să prezinte o formă de disomie uniparentală.

1.3. ANOMALIILE CROMOSOMICE STRUCTURALE

Anomaliile cromosomice de structură (numite şi „mutaţii cromosomice") se produc, în mod clasic, prin ruperea cromosomilor şi reunirea anormală a capetelor cromosomilor rupţi.

În condiţii experimentale – prin tratarea celulelor umane în cultură cu agenţi „clastogeni" (radiaţii ionizante sau unele substanţe chimice) – s-a stabilit că ruperea unui cromosom produce două capete instabile, deoarece nu au telomere. Mecanismele de reparare asigură de obicei reunirea corectă a capetelor rupte şi refacerea integrităţii cromosomice (*„restituţio ad integrum"*). Totuşi, când se produc mai multe rupturi – în unul, doi sau mai mulţi cromosomi – se poate produce o *reunire incorectă* a capetelor rupte şi rezultă *cromosomi „derivativi"*, cu o structură anormală. Ei pot fi stabili în condiţiile în care au un centromer şi telomere, structuri ce le asigură segregarea/ transmiterea lor în cursul diviziunii celulare. În schimb, cromosomii derivativi *acentrici, dicentrici sau fără telomere* se caracterizează printr-o instabilitate crescută şi se vor pierde în timpul diviziunii.

Cele mai multe anomalii structurale spontane, din celulele germinale sau somatice, se produc însă foarte probabil prin erori de recombinare.

Recombinarea meiotică este precedată de sinapsa cromosomilor omologi, ce implică împerecherea unor secvenţe identice sau foarte asemănătoare de ADN repetitiv din structura lor; împerecherea *incorectă* generează, prin crossing over *inegal*, deleţia sau duplicaţia unor segmente cromosomice. De asemenea, se poate produce o sinapsă între regiuni identice din cromosomi neomologi, care poate să determine o recombinare accidentală şi producerea unui transfer de segmente între aceşti cromosomi (o translocaţie). Recombinarea omologă nealelică sau ectopică se poate produce şi în celulele somatice, între cromatidele unui cromosom sau între cromosomi omologi (vezi sectiunea 6.B.1.3)

În funcţie de numărul de cromosomi implicaţi şi de numărul de rupturi se produc (prin reparare greşită sau recombinare între cromosomi neomologi) mai multe tipuri de anomalii structurale stabile, sistematizate în tabelul 6.5; la acestea se adaugă un tip special reprezentat de isocromosomi.

Tabelul 6.5 Anomalii structurale stabile produse prin repararea greşită a rupturilor cromosomice sau erori de recombinare.
(după Strachan şi Read, 1999)

	Un cromosom implicat	**Doi cromosomi implicaţi**
O ruptură	Deleţie terminală	—
Două rupturi	Deleţie interstiţială Cromosom inelar Duplicaţie sau deleţie prin schimb inegal	Translocaţie reciprocă Translocaţie Robertsoniană Duplicaţie sau deleţie

[18] Efectul fenotipic al unui astfel de mozaic poate fi mai grav în condiţiile în care prin pierderea cromosomului suplimentar rezultă o disomie uniparentală, iar cromsomul resepctiv are loci amprentaţi genetic (vezi capitolul 5.C şi 5.D)

	între cromatidele surori Inversie	prin recombinare inegală
Trei rupturi	Rearanjări cromosomice variate (de ex., inversie cu deleţie; inserţie intracromosomică)	Inserţie intracromosomică (directă sau inversată)

În funcţie de consecinţele fenotipice pe care le produc, anomaliile de structură ale cromosomilor se împart în:

- *anomalii echilibrate* când nu se produce pierdere sau câştig de material cromosomic (translocaţii reciproce echilibrate, inversii) iar fenotipul este, de regulă, normal;
- *anomalii neechilibrate* atunci când există plus sau minus de material cromosomic (deleţii, cromosomi inelari, duplicaţii) care produce un fenotip anormal.

a). Anomaliile structurale ce implică un singur cromosom.

(1). Deleţiile

Deleţiile (*del*) sunt anomalii cromosomice structurale neechilibrate, caracterizate prin pierderea unui fragment cromosomic.

- În funcţie de localizarea segmentului pierdut, deleţiile pot fi *terminale* şi *interstiţiale*.
  - Clasic, deleţiile terminale rezultă prin ruperea unui cromosom într-un punct, urmată de pierderea fragmentului terminal acentric şi formarea unui nou telomer la capătul rupt. Deleţiile interstiţiale sunt produse prin ruperea unui cromosom în două puncte, situate pe acelaşi braţ, urmată de pierderea fragmentului interstiţial şi reunirea fragmentelor restante (figura 6.24).
  - În prezent, se consideră că marea majoritate a deleţiilor sunt interstiţiale iar mecanismul cel mai frecvent de producere îl reprezintă *recombinarea omologă nealelică* intracromosomică sau intercromosomică, mediată de o împerechere greşită a cromosomilor, datorită unor secvenţe repetitive identice sau foarte asemănătoare dar nealele (figura 6.24). Deleţiile se mai pot produce prin segregarea meiotică a cromosomilor cu translocaţii echilibrate, inserţii sau inversii (vezi secţiunile următoare).
- Din punct de vedere al dimensiunilor, deleţiile se împart în *deleţii microscopice (≥ 5Mb)* – vizibile prin marcaj cromosomic, de preferinţă a celui de înaltă rezoluţie – şi *deleţii submicroscopic,e* evidenţiate prin folosirea tehnicilor de citogenetică moleculară (FISH), cu sonde pentru regiunea presupusă a fi absentă din cariotipul individului.

În practică, cele mai frecvente deleţii sunt descrise în braţele scurte ale cromosomilor 4 (sindromul Wolf Hirschhorn), 5(sindromul *cri du chat*), 11, şi 18, precum şi în braţele lungi ale cromosomilor 7, 11, 13, 15, 18, 21 şi 22; de asemenea pot fi implicaţi în deleţii şi cromosomii X şi Y. Deleţiile autosomale microscopice au o incidenţă de 1 la 7000 nou născuţi vii. Cea mai frecventă deleţie, de obicei submicroscopică, este *del* 22q11 (sindromul DiGeorge-Velocardiofacial) cu o incidenţă de 1 : 2000.

Toate deleţiile produc **o monosomie parţială** (*haploinsuficienţă*) pentru genele localizate în regiunea cromosomică absentă. Viabilitatea produsului de concepţie cu deleţie depinde de dimensiunea fragmentului absent. În general, se consideră că o monosomie parţială ce depăşeşte 2% din lungimea unui set haploid de cromosomi este incompatibilă cu supravieţuirea. Deleţiile submicroscopice sau microdeleţiile produc **sindroame ale genelor contigue**, în care manifestările fenotipice sunt determinate de pierderea mai multor gene învecinate. Principalele sindroame cromosomice cu deleţii sau microdeleţii sunt prezentate în capitolul 10.

(2). Cromosomii inelari

Cromosomii inelari (*r*), sunt cromosomi anormali, caracterizaţi printr-o conformaţie circulară. Mecanismul de producere al acestei anomalii constă în ruperea unui cromosom în două puncte localizate pe braţe diferite, urmată de pierderea fragmentelor acentrice (terminale) şi unirea capetelor fragmentului centric (figura 6.25). Practic se realizează o deleţie / o monosomie parţială a unor segmente terminale din braţele cromosomului.

Cromosomii inelari întâmpină dificultăţi de segregare în cursul mitozei, fiind caracterizaţi printr-o mare instabilitate. Datorită acestei particularităţi frecvenţa cromosomilor inelari este redusă. În practica medicală au fost descrise cazuri cu: r(X), r(21), r(18), r(22) şi r(15).

(3). Duplicaţiile

Duplicaţiile (*dup*) sunt anomalii cromosomice structurale neechilibrate, caracterizate prin prezenţa pe unul dintre cromosomi a unui segment în dublu exemplar. Consecinţa genotipică o reprezintă apariţia unei trisomii parţiale pentru segmentul cromosomic duplicat.

Majoritatea duplicaţiilor sunt rezultatul unui *crossing-over inegal* între cromosomii omologi în cursul pahitenului, favorizat de prezenţa unor secvenţe de ADN repetitiv sau de similitudinea între secvenţele unor gene (figura 6.26). Alte surse de trisomii parţiale sunt recombinarea intracromosomică la nivelul unei inversii şi segregarea cromosomilor în meioza I în cazul unor translocaţii echilibrate.

Cele mai frecvente duplicaţii sunt: *dup*12q, care produce sindromul Pallister şi *dup*17q care determină boala Charcot – Marie – Tooth (vezi 6.B.1.3).

(4). Inversiile

Inversiile (*inv*) rezultă prin ruperea cromosomului în două puncte, urmată de rotirea fragmentului intermediar cu 180^0 şi reunirea fragmentelor. În funcţie de localizarea punctelor de ruptură, inversiile se clasifică în:

- *paracentrice* – dacă cele două puncte de ruptură sunt situate pe acelaşi braţ, iar fragmentul rotit nu conţine centromerul (figura 6.27.a);
- *pericentrice* – dacă cele două puncte de ruptură sunt situate pe braţe diferite, iar fragmentul rotit conţine centromerul (figura 6.27.b); pot produce modificarea morfologiei cromosomului.

Inversiile sunt anomalii cromosomice echilibrate, care nu produc, de regulă, modificări fenotipice[19], deoarece nu determină modificări ale cantităţii de material genetic, ci doar *repoziţionarea* unor gene în cromosom. Excepţiile apar când unul din punctele de ruptură este localizat în interiorul unei gene, ducând la modificarea distanţei dintre porţiunea centrală şi cea reglatoare a unei gene sau la disrupţia secvenţei codante.

În schimb, inversiile pot produce *tulburări reproductive* (sterilitate, avorturi spontane, naşterea unor copii plurimalformaţi) determinate de recombinarea intracromosomică în regiunea cu inversie. Datorită faptului că genele nu mai sunt poziţionate normal, sinapsa între cromosomii omologi nu se poate face corect ("genă la genă") decât dacă cromatida cu inversie formează o buclă la nivelul inversiei (figura 6.28). Producerea unui crossing-over la acest nivel poate produce gameţi neechilibraţi; tipul de anomalie cromosomică depinde de tipul de inversie.

- În cazul inversiilor paracentrice, gameţii anormali pot avea un cromosom dicentric sau un cromosom acentric (figura 6.28.a); ambii sunt instabili, iar supravieţuirea unui embrion cu astfel de anomalii este improbabilă. De aceea un cuplu în care unul dintre membri este purtător al unei inversii paracentrice va avea doar copii sănătoşi (normali sau purtători de inversie) şi un număr mare de avorturi spontane repetate.
- În cazul inversiilor pericentrice, gameţii anormali pot avea cromosomi cu duplicaţia (trisomie parţială) şi deleţia (monosomie parţială) segmentelor cromosomice distale de inversie (figura 6.28.b);

Circa una la 1000 de persoane din populaţia generală poartă o inversie şi are un risc de 5-10% – în funcţie de mărimea şi poziţia inversiei, precum şi de crosomomul implicat – de a avea un descendent cu cariotip anormal.

(5). Isocromosomii

Isocromosomii (*i*) sunt cromosomi anormali, simetrici, caracterizaţi prin prezenţa în dublu exemplar a unuia dintre braţe (trisomie parţială) şi absenţa (monosomie parţială) celuilalt braţ. (figura 6.29); pot fi deci isocromosomi de braţ scurt sau de braţ lung.

Mecanismul clasic de formare a isocromosomilor implică o eroare mitotică - clivarea transversală a centromerului – care determină formarea unui cromosom alcătuit numai din

[19] Inversia pericentrică a cromosomului 9 – inv(9)(p11q12) – este considerată o variantă fenotipică normală.

braţe scurte şi a unuia constituit numai din braţe lungi. Totuşi, acest mecanism a fost rareori dovedit. Un mecanism mult mai probabil este reprezentat de apariţia unui schimb inegal de material cromosomic între cromosomii omologi (cromatidele surori) la extremitatea proximală a braţelor, adiacent centromerului. În acest mod rezultă de fapt un cromosom dicentric, dar prin metodele citogenetice clasice este imposibilă vizualizarea ambelor centromere, localizate foarte apropiat unul de celălalt.

Cel mai frecvent isocromosom este i(Xq) identificat la unele paciente cu sindrom Turner. Mai rar au fost depistaţi isocromosomi ai unor autosomi – i(18p), i(12p), i(21q).

(6). Cromosomii marker

Pe preparatele cromosomice se observă ocazional cromosomi foarte mici, a căror origine este dificil de stabilit, numiţi cromosomi „marker". Frecvent ei sunt prezenţi sub formă de mozaic cromosomic, reprezentând un *extra-cromosom sau cromosom* supranumerar faţă de cariotipul normal sau anormal de bază. Cromosomii marker pot conţine secvenţele pericentromerice ale unui cromosom (mai frecvent 15 sau X) sau pot fi mici cromosomi inelari. Cea mai dificilă problemă este identificarea unui cromosom marker supranumerar în anlizele prenatale (1:2500); din cauza originii diferite – dificil de stabilit prin tehnicile uzuale – riscul unor anomalii fetale asociate poate varia de la foarte mic, la foarte mare.

b). Anomaliile structurale ce implică doi cromosomi.

(1). Translocaţiile

Translocaţiile se caracterizează prin transferul de segmente cromosomice între doi cromosomi, de obicei neomologi. Pot fi trei tipuri majore: *translocaţii reciproce, translocaţii prin fuziune centrică (Robertsoniene) şi inserţii*

Translocaţiile reciproce

Translocaţiile reciproce (*t*) se produc prin ruperea (în cursul interfazei) a doi cromosomi neomologi, fiecare în câte un punct, urmată de schimbul reciproc al fragmentelor acentrice şi realipirea fragmentelor rupte, cu formarea a doi cromosomi derivativi (figura 6.30.a).

Incidenţa translocaţiilor reciproce în populaţia generală este de aproximativ 1:400 de indivizi. Frecvenţa acestor anomalii este mai mare la bărbaţii cu sterilitate primară şi la cuplurile cu avorturi spontane recurente. De regulă, translocaţiile reciproce sunt specifice unei anumite familii. O translocaţie relativ frecventă este însă aceea dintre braţele lungi ale cromosomilor 11 şi 22.

Purtătorii de translocaţii reciproce echilibrate au de obicei un fenotip normal, deoarece anomalia nu modifică cantitatea totală de material genetic. În schimb, pot apărea tulburări de reproducere, determinate de modul particular de sinapsă şi de segregare a cromosomilor derivativi, cu translocaţia de segmente, în cursul meiozei I. Translocaţiile reciproce pot determina blocarea spermatogenezei şi sterilitate; femeile purtătoare pot avea o fertilitate redusă. Atunci când gametogeneza este posibilă se pot forma gameţi normali şi anormali, funcţie de modul de segregare (figura 6.30.b şi c).

În cursul meiozei I, datorită translocaţiei reciproce, cromosomii omologi formează o sinapsă specială, numită *cvadrivalent,* cu aspect de cruce (figura 6.30.b). La nivelul acestei structuri se produce alinierea regiunilor omologe ale cromosomilor implicaţi în translocaţie. În cursul anafazei I, când se produce segregarea cromosomilor omologi, cromosomii cvadrivalentului pot urma trei căi de segregare: 2:2; 3:1; 4:0 – diferite prin numărul cromosomilor ce se distribuie celulelor fiice. Ultimele două căi, complet dezechilibrate, sunt foarte rare şi conduc la gameţi cu anomalii genetice majore, incompatibili pentru reproducere. Segregarea 2:2 se poate face în trei moduri (figura 6.30.c): *altern, adiacent-1* şi *adiacent-2*.

- În cazul *segregării alterne*, cromosomii normali migrează la un pol al fusului de diviziune, la celălalt pol deplasându-se cromosomii cu translocaţie. Astfel, rezultă gameţi echilibraţi genetic, prin a căror fecundare se formează, fie zigoţi normali, fie zigoţi purtători ai translocaţiei echilibrate.
- În *segregarea adiacentă-1* centromerii neomologi segregă împreună, în timp ce în *segregarea adiacentă-2* se produce o segregare asociată a centromerilor omologi. În ambele tipuri de segregare rezultă gameţi anormali (cu disomie şi nulisomie parţială), care prin fecundare vor conduce la zigoţi ce asociază trisomia parţială a unuia dintre cromosomi cu monosomia parţială a celuilalt cromosom.

În translocaţiile reciproce echilibrate riscul teoretic de apariţie a unor descendenţi anormali (cu trisomie sau monosomie parţială) este ridicat - 50% - dar riscul practic de apariţie a unor copii cu anomalii cromosomice neechilibrate este de 1-10%, dependent de tipul translocaţiei, deoarece majoritatea embrionilor neechilibraţi sunt neviabili.

Translocaţiile robertsoniene

Translocaţiile Robertsoniene (*rob*) implică doi cromosomii acrocentrici (exceptând cromosomul Y), omologi sau neomologi. Aceştia se rup la nivelul centromerelor sau pe braţele scurte, foarte aproape de centromer, braţele lungi fuzionează şi formează un cromosom derivativ, monocentric sau pseudodicentric, iar braţele scurte se pierd (figura 6.31). Ca urmare, numărul de cromosomi se reduce la 45; deoarece braţele scurte ale celor cinci perechi de acrocentrici au copii multiple ale genelor pentru ARN ribosomal, pierderea braţelor scurte a doi acrocentrici nu va fi nocivă (rămân un număr suficient de copii pe cromosomii acrocentrici normali) iar fenotipul va fi normal,

Incidenţa globală a translocaţiilor Robertsoniene în populaţie este de aproximativ 1/1000 de indivizi, cele mai frecvente fiind translocaţiile dintre cromosomii 13 şi 14 – rob(13q14q) – şi între cromosomii 21 şi 14 – rob(21q14q); afectând aproximativ 1/1300 de persoane, rob(13q14q) este cea mai frecventă anomalie structurală la om.

Translocaţiile Robertsoniene, deşi nu afectează fenotipul, pot produce gameţi şi descendenţi anormali. Riscul de apariţie a unor descendenţi anormali este diferit în funcţie de tipul cromosomilor implicaţi în translocaţie (omologi sau neomologi) şi de sexul părintelui purtător.

- În cazul unei translocaţii între cromosomi neomologi, de exemplu între cromosomii 14 şi 21, se pot forma 6 tipuri de gameţi (figura 6.31.c.); prin fecundarea lor cu gameţi normali rezultă şase tipuri de zigoţi: normal, echilibrat cu translocaţie Robertsoniană, cu trisomie 14, cu monosomie 14, cu trisomie 21, cu monosomie 21. Zigoţii monosomici şi cu trisomie 14 dau embrioni neviabili, eliminaţi prin avorturi spontane. În această situaţie, riscul teoretic de apariţie al unui copil cu trisomia 21 (sindrom Down) este de 33%; riscul real este mai mic (deoarece o parte din embrionii cu trisomie 21 sunt eliminaţi prin avort spontan) şi depinde de sexul purtătorului: în cazul femeilor riscul este de 10%, în timp ce la bărbaţi riscul este de 1-3%, deoarece anomalia blochează de obicei spermatogeneza.
- O situaţie specială se întâlneşte în cazul purtătorilor unei translocaţii Robertsoniene între cromosomi omologi, de exemplu, *între* doi cromosomi 21; ei formează gameţi cu disomie 21 şi cu nulisomie 21 care, după fecundare cu un gamet normal, vor forma zigoţi cu trisomie 21 sau cu monosomie 21 (neviabili). Acest caz constituie una din puţinele situaţii în care riscul de recurenţă al unei afecţiuni genetice este de 100%.

Inserţiile

Inserţiile (*ins*) sunt translocaţii nereciproce, care implică transferul unui fragment cromosomic de pe un cromosom pe un cromosom neomolog. Mecanismul de apariţie al anomaliei constă în ruperea a doi cromosomi neomologi, dar necesită trei puncte de ruptură, două pe un cromosom şi unul pe celălalt cromosom; fragmentul liber al cromosomului cu două rupturi este transferat şi inserat (în poziţie normală sau inversat) la nivelul punctului de ruptură al celui de-al doilea cromosom (figura 6.32). Datorită acestei particularităţi, inserţiile sunt anomalii cromosomice relativ rare.

În cazul inserţiilor, anomalia nu modifică fenotipul purtătorului, dar poate conduce la tulburări de reproducere, datorite malsegregării cromosomilor derivativi în cursul meiozei I. Un individ purtător al unei translocaţii cu inserţie poate avea copii normali, copii purtători ai anomaliei echilibrate, copii cu monosomie parţială şi copii cu trisomie parţială.

(2). Cromosomii dicentrici

Cromosomii dicentrici (*dic*) se formează printr-o translocaţie neechilibrată, cu ruperea în câte un punct a doi cromosomi, urmată de unirea fragmentelor centrice într-un cromosom derivativ şi pierderea fragmentelor acentrice. Numărul de cromosomi din celulă se reduce de la 46 la 45 (figura 6.33). De obicei, cromosomii dicentrici sunt instabili în cursul mitozei[20];

[20] Prezenţa ambelor centromere rămase active determină anomalii de ataşare la fibrele fusului de diviziune şi dificultăţi de segregare în cursul diviziunii, ceea ce conduce la dispariţia frecventă a lor.

menţinerea lor pe parcursul a mai multor generaţii celulare se face prin inactivarea unuia dintre centromere (pseudodicentrici).

1.4. DISOMIILE UNIPARENTALE

Disomiile uniparentale sunt *anomalii cromosomice funcţionale*, caracterizate prin prezenţa unei perechi de cromosomi moştenite de la acelaşi genitor (vezi şi capitolul 5.C.3.2).

Mecanismul de producere a disomiilor uniparentale implică procese de *corectare* ("*salvare*") a unor aneuploidii omogene, existente în primele etape ale embriogenezei. În cazul corectării unei monosomii, aceasta poate fi "salvată" prin duplicarea cromosomului implicat, rezultând obligatoriu o disomie uniparentală. În cazul prezenţei unei trisomii, corecţia constă în *eliminarea* unuia dintre cei trei cromosomi omologi; în funcţie de originea trisomiei (nedisjuncţie în mieoza I sau în meioza II) (vezi figura 5.20) şi de cromosomul pierdut există trei posibilităţi:

- zigot disomic normal, cu câte un cromosom de la fiecare din părinţi;
- zigot cu doi cromosomi identici de la un părinte (isodisomie);
- zigot cu doi cromosomi diferiţi de la un părinte (heterodisomie).

Disomia uniparentală poate avea efecte patologice atunci când realizează o stare de homozigoţie a unei gene recesive sau cînd cromosomul implicat conţine gene amprentate (vezi capitolul 4.D.1.2.b)

> Genomurile parentale nu sunt echivalente funcţional. La nivelul anumitor loci se exprimă fenotipic, fie alela de origine maternă, fie cea de origine paternă (cea de a doua alelă fiind inactivă). Amprentarea genomică (parentală) este stabilită în cursul spermatogenezei sau ovogenezei şi constă în marcarea specifică a anumitor gene localizate pe unii cromosomi. Procesul are două etape: ştergerea amprentării moştenită de la părinţi şi introducerea noii amprentări caracteristice sexului individului respectiv (vezi figura 4.22). Zigotul rezultat în urma fertilizării gameţilor va moşteni astfel două genomuri parentale marcate specific şi diferite funcţional. Marcarea acestor gene, de regulă implicate în embriogeneză, constă fie în inactivarea prin metilare a uneia dintre alele (maternă sau paternă) fie în modificarea regiunii reglatoare a uneia dintre alele.

Un exemplu de corectare a unei trisomii 15 este prezentat în figura 6.34. În cazul trisomiei 15 de origine paternă, prin pierderea cromosomului 15 de origine maternă se va naşte un copil cu sindrom Angelman. În cazul trisomiei 15 de origine maternă, prin pierderea cromosomului 15 de origine paternă se va naşte un copil cu sindrom Prader-Willi.

Teoretic, pot exista disomii uniparentale pentru toţi cromosomii umani. Până la ora actuală au fost identificate 23 de disomii uniparentale, dintre care următoarele au implicaţii patologice: 15q paternă (*sindrom Angelman*), 15q maternă (*sindrom Prader-Willi*), 11p paternă (*sindrom Beckwith-Wiedemann*), 6 paternă (*diabetul zaharat tranzitoriu al nou-născutului*), 7 maternă (*sindrom Silver – Russell*).

1.5. ANOMALIILE CROMOSOMICE DOBÂNDITE

Anomaliile cromosomice dobândite se pot produce în celulele somatice, după naştere, sub acţiunea unor agenţi mutageni sau spontan, în anumite sindroame de instabilitate cromosomică sau în tumori şi leucemii.

Diferiţi **agenţi mutageni**, substanţe chimice sau radiaţiile ionizante, pot determina rupturi cromatidiene (în G2) sau cromosomice (în G1) şi uneori cromosomi inelari, dicentrici, deleţii sau translocaţii; frecvenţa lor este proporţională cu intensitatea expunerii şi eficienţa mecanismelor de reparare.

Mai multe sindroame ereditare monogenice (sindromul Bloom, anemia Fanconi, Ataxia-telangiectazia, sindromul Nijmegen, sindromul ICF, sindromul Roberts, Xeroderma pigmentosum) se caracterizează prin **instabilitatea cromosomică**. Bolnavii cu aceste afecţiuni prezintă, în culturi celulare (limfocite) de scurtă durată, un procentaj anormal de mare de rupturi cromosomice sau cromatidiene, schimburi de fragmente şi figuri triradiale sau cvadriradiale (ce atestă un crossing over somatic) sau alte defecte (instabilitate centromerică,

separarea regiunilor de heterocromatină etc); de subliniat faptul că aceste modificări nu sunt clonale. Natura modificării cromosomice şi defectul molecular (în replicarea sau repararea ADN) care stă la baza ei sunt diferite în fiecare afecţiune. Majoritatea acestor sindroame au un risc crescut de cancerizare.

Celulele maligne pot prezenta diferite anomalii cromsosomice care nu există în ţesuturile neimplicate în procesul tumoral. Anomaliile cromosomice în tumori şi leucemii se pot clasifica în manifestări citologice ale amplificării genomice, anomalii clonale (care au adesea un caracter neîntâmplător) şi anomalii secundare.

- Amplificările genomice se pot manifesta citologic fie prin cromosomi *„double minutes"* – cromosomi minusculi, ce apar dedublaţi în metafază – fie prin segmente cromosomice colorate omogen (*HSR- homogeneously staining region*) sau anormal (*ABR- abnormal banded region*). Aceste modificări corespund unor segmente cromosomice în care anumite gene (oncogene) sunt multiplicate considerabil.
- Anomaliile clonale sunt mai frecvente în anumite tipuri de neoplazii, fiind mai mult sau mai puţin specifice; de exemplu, t(15;17)(q22;q12) în leucemia acută cu promielocite sau deleţia 13q14 în retinoblastom. Dar specificitatea lor nu este absolută; de exemplu, translocaţia t(9;22)(q34:q11), ce corespunde cromosomului Philadelphia, era considerată specifică leucemiei mieloide cronice dar a fost descrisă şi în anumite leucemii acute. Cert este faptul că diferite tipuri de anomalii structurale, caracteristice unor neoplazii, produc o serie de modificări moleculare (dereglarea expresiei unor oncogene, formarea unor gene hibride, pierderea unor gene supresoare de tumori) implicate în etiopatogenia tumorală (vezi capitolul 17).
- Anomaliile secundare (de număr şi/sau structură) apar în stadiile mai tardive şi invazive ale dezvoltării tumorale. Ele sugerează faptul că un element important al progresiei cancerului este alterarea unor gene implicate în menţinerea integrităţii şi stabilităţii cromosomilor şi în asigurarea segregării lor mitotice corecte.

2. CONSECINŢELE FENOTIPICE ALE ANOMALIILOR CROMOSOMICE

În funcţie de consecinţele fenotipice, anomaliile cromosomice se pot împărţi în două mari categorii:

- *anomalii neechilibrate* – în care de regulă se produce un plus sau un minus de material cromosomic şi fenotipul este *anormal*;
- *anomalii echilibrate* – fără modificări cantitative de material genetic şi cu fenotip normal.

În prima categorie se încadrează, firesc, toate anomaliile numerice (poliploidiile, trisomiile, monosomiile) şi o parte din anomaliile de structură, cele neechilibrate (deleţiile, cromosomii inelari, duplicaţiile, isocromosomii), în care se produc trisomii (foarte rar tetrasomii) sau monosomii parţiale. În a doua categorie se includ translocaţiile reciproce echilibrate, inversiile şi inserţiile, care nu modifică cantitatea de material cromosomic. Această clasificare este relativă deoarece:

- în translocaţiile Robertsoniene se pierd totuşi porţiuni din braţele scurte ale cromosomilor acrocentrici implicaţi, dar fenotipul ramâne normal întrucât segmentele pierdute conţin gene pentru ARN ribosomal (care se găsesc în cantitate suficientă pe braţele scurte ale celorlalţi acrocentrici);
- uneori translocaţiile şi inversiile pot produce un fenotip anormal dacă punctele de ruptură alterează secvenţele codante sau reglatoare ale unor gene sau plasează unele gene într-o regiune cu heterocromatină inactivă;
- disomiile uniparentale nu modifică cantitatea de material genetic dar pot determina, prin mecanismele precizate, un fenotip anormal.

2.1 CONSECINŢELE ANOMALIILOR CROMOSOMICE NEECHILIBRATE

Anomaliile cromosomice de număr sau structură neechilibrate sunt modificări *cantitative* ale materialului genetic, „*anomalii de dozaj genic*" întrucât informaţia genetică din cromosomii supranumerari sau modificaţi structural este *calitativ normală*. Pentru aceasta pledează faptul că indivizii fertili cu anomalii cromosomice numerice (de exemplu, femei cu trisomie 21 sau cu trisomie X) pot avea descendenţi normali. Fenotipul anormal este consecinţa unui exces (+ 50%) sau a unei lipse (-50%) de gene normale.

Dezechilibrul genetic, indiferent de tip, determină o serie de „*semne comune*" (Opitz, 1981): tulburări de creştere prenatală şi postnatală, dismorfie facială şi frecvent anomalii congenitale majore multiple, displazii, dermatoglife anormale, alterări ale structurii şi funcţiei SNC (întârziere în dezvoltarea psiho-motorie), tulburări ale funcţiei gonadale. Cunoaşterea lor poate orienta un diagnostic spre categoria „boli cromosomice".

Gravitatea afectării fenotipice depinde de mai mulţi factori.

(1). *Mărimea dezechilibrului genetic*. Poliploidiile, trisomiile cromosomilor mari şi monosomiile autosomale sunt letale iar gravitatea trisomiilor autosomale viabile este proporţională cu mărimea cromosomului (tri 13 > tri 18 > tri 21).

(2). *Tipul de anomalie*.

- Monosomiile sunt mai grave decât trisomiile şi sunt letale pentru toţi autosomii precum şi în cazul majorităţii monosomiilor X (sunt autori care consideră că cele mai multe din pacientele cu cariotip 45,X prezintă de fapt o monosomie X în mozaic 46,XX/45,X dar că linia normală lipseşte în limfocite)
- Aneuploidile cromosomilor sexuali sunt mai puţin grave decât cele autosomale, datorită inactivării parţiale a cromosomilor X suplimentari.

(3). *Conţinutul genic şi cantitatea de eucromatină* / heterocromatină a cromosomului implicat. În acest context, se explică de ce trisomia 21 este mai puţin gravă decât trisomia 22 – ambii cromosomi fiind apropiaţi ca mărime, precum şi *semnele specifice şi gravitatea diferită* a unor trisomii parţiale pentru segmente identice ca dimensiune. Anomaliile ce interesează benzile R (pozitive) alcătuite din eucromatină sunt mai grave decât cele ce interesează benzile G (pozitive), bogate în heterocromatină.

(4) *Numărul celulelor afectate*. Aneuploidiile omogene sunt mai grave decât cele reprezentate de mozaicuri de celule anormale şi normale. Reamintim (vezi 5.B.2.3 şi 5.D.3.) că efectele fenotipice ale mozaicurilor cromosomice depind de:

- momentul ontogenetic în care se produc (apariţie precoce – gravitate mai mare);
- distribuţia clonelor în diferite ţesuturi (vezi *mozaicism limitat la placentă;* mozaicurile germinale sau clonele celulare ce produc cancer);
- tipul cromosomului implicat (mozaicurile gonosomale sunt mai puţin grave decât cele autosomale.

2.2 CONSECINŢELE ANOMALIILOR CROMOSOMICE ECHILIBRATE

Aşa cum am precizat mai sus, cu câteva excepţii, anomaliile cromosomice echilibrate – translocaţiile reciproce, inversiile şi inserţiile – determină un fenotip normal. Ele pot avea însă consecinţe reproductive serioase (vezi şi capitolul 10.A):

- blocarea gametogenezei datorită sinapsei neobişnuite între cromosomii omologi, determinată de prezenţa anomaliei structurale;
- producerea de gameţi anormali (figurile 6.28, 6.30 şi 6.31) care, după fecundare, determină formarea de embrioni cu monosomii şi/sau trisomii parţiale (complete în cazul translocaţiilor Robertsoniene); frecvent dezechilibrul cromosomic este important şi aceşti embrioni se elimină ca avorturi spontane.

S-a stabilit că la 3- 6% din cuplurile sterile sau cu avorturi spontane repetate unul sau altul din membrii cuplului prezintă o anomalie cromosomică echilibrată. În acest context să reamintim că una din 400 de persoane aparent sănătoase din populaţie are o translocaţie, 1: 1000 – o translocaţie Robertsoniană şi 1 : 1250 prezintă o inversie; deci, cel puţin 4 : 1000 de

persoane sunt purtătoare de anomalii cromosomice echilibrate ce pot da tulburări de reproducere majore.

3. FRECVENŢA ŞI CAUZELE ANOMALIILOR CROMOSOMICE

Frecvenţa anomaliilor cromosomice la om este foarte mare comparativ cu alte specii. Deşi estimările efectuate pe diferite categorii de celule şi fenotipuri umane – de la gameţi, la nou născuţi şi adulţi (tabelul 6.6) – sunt dependente de metode şi loturi, iar datele actuale sunt foarte probabil *subevaluări* ale fenomenului real, se poate conchide – fără rezerve – că anomaliile cromosomice reprezintă o cauză importantă de morbiditate şi mortalitate.

Tabelul 6.6 Frecvenţele aproximative ale anomaliilor cromosomice în diferite populaţii
(excluzând deleţiile detectate prin FISH)

Populaţie	Frecvenţa anomaliilor (%)
Spermatozoizi (bărbaţi normali şi fertili)	**≥ 10 (?)**
Ovule (femei normale şi fertile)	**≥ 10 (?)**
Toţi zigoţii	**10 – 30**
Embrioni în stadiul preimplantator (studii de fertilizare in vitro)	**20 – 25**
Sarcini recunoscute clinic (5 – 28 spt)	**≥ 8**
Avorturi spontane:	
Sarcini nerecunoscute clinic (≤ 4 spt)	**90 (?)**
Sarcini 5 – 8 spt	**60**
Sarcini 9 – 12 spt	**12 – 32**
Toate sarcinile recunoscute clinic (5–28spt)	**≥ 30 – 35**
Nou născuţi morţi (≥ 28 spt)	**5 – 6**
Nou născuţi vii	**0.5 – 1**
Decese neonatale şi la sugari	**5 – 7**
Pacienţi cu malformaţii congenitale	**4 – 8**
Pacienţi cu malformaţii cardiace	**13**
Retard mintal (excluzând X fragil)	**3 – 35**
QI ≤ 20	3 – 10
QI = 20 – 49	12 – 35
QI = 50 – 69	3
Alte tulburări de dezvoltare neuropsihică	**1 – 3 (?)**
Sindromul X fragil	**0.4**
Hermafroditism adevărat	**25**
Bărbaţi - defecte în diferenţierea sexuală	**≤ 25**
Femei - tulburări de dezvoltare pubertară	**≤ 27**
Deficienţă ovariană primară	**65**
Bărbaţi sterili	**2 – 15**
Cupluri cu ≥ 3 avorturi spontane	**2 – 5**

Surse: Hooket, 1992; Jacobs, 1992; Hassold et al, 1996; Eichenlaub-Ritter, 1996; Gardner şi Southerland, 1996; Chandley, 1997; Garber et al, 1997; Hsu, 1998; Mange, 1999

Anomaliile cromosomice au fost detectate la:

- circa 10% din gameţi, la persoane – bărbaţi şi femei – normale şi fertile;
- 3% din fetuşii de 10 săptămâni şi 2% din cei de 15-16 saptamâni;
- 50 - 60% din avorturile spontane precoce (15-25% din toate sarcinile);
- 10 % din nou născuţi morţi (1% din toate sarcinile);
- 0,7 – 1 % din nou-născuţi vii (> 1:120);
- 2% din sarcinile femeilor cu vârsta mai mare de 35 de ani în momentul concepţiei.

Incidenţa diferitelor tipuri de anomalii cromosomice la nou nascuţii vii este prezentată în tabelul 6.7. Se observă că *anomaliile neechilibrate*, numerice şi structurale la un loc,

reprezintă aproape jumătate din totalul anomaliilor cromosomice şi, deci, numai *1 la 250 de nou născuţi au un fenotip anormal* produs de un dezechilibru cromosomic. Faţă de alte studii epidemiologice mai vechi, surprinde frecvenţa mai mare a anomaliilor structurale (5 ‰ din nou născuţi şi 60 % din toate anomaliile cromosomice) şi în mod deosebit a anomaliilor echilibrate 4,30 ‰ sau 1 la 232 nou născuţi vii; acest fapt este firesc (anomaliile numerice produc mai frecvent un dezechilibru grav, letal) şi reflectă indiscutabil sporirea calităţii metodelor de analiză citogenetică. Cert este că datele cuprinse în tabelele 6.6 şi 6.7 sunt subestimări ale valorilor reale deoarece nu includ sindroamele cu microdeleţii identificabile prin FISH; numai sindromul velo-cardio-facial (del 22q11) are o frecvenţă sub 1:1000 nn fiind probabil a doua anomalie cromosomică ca frecvenţă, după sindromul Down.

Tabelul 6.7 Incidenţa anomaliilor cromosomice la nou-născuţi
(Hook, 1992)

Tipuri de anomalii	Frecvenţă ‰
Triploidii	**0,02**
Trisomii autosomale	**1,40**
Trisomie 13	0,08
Trisomie 18	0,15
Trisomie 21	1,20
Aneuploidii gonosomale la băieţi	**2,75**
47,XXY	1,00
47,XYY	1,00
altele	0,75
Aneuploidii gonosomale la fete	**1,80**
45,X şi 45,X/46,XX	0,30
47,XXX	1,10
altele	0.37
Anomalii structurale echilibrate	**4,30** (1/232)
Translocaţii reciproce	2,50
Translocaţii Robertsoniene	1,00
Inversii	0,80
Anomalii structurale neechilibrate	**0,70**
Anomalii cromosomice neechilibrate (numerice şi structurale)	**4,00** (1/250)
TOTAL anomalii cromosomice	**8,30** (1/120)

Datele actuale despre frecvenţa anomaliilor cromosomice reprezintă un motiv în plus pentru a studia cauzele şi mecanismele patogenice cu scopul de a identifica posibile intervenţii profilactice. Din păcate, în acest domeniu nu s-au înregistrat elemente noi. Este cert doar faptul că etiopatogenia anomaliilor numerice diferă de cea a nomaliilor structurale.

Cauzele aneuploidiilor produse prin erori de distribuţie (nedisjuncţie, pierdere anafazică) sunt încă neelucidate. Singura certitudine este asocierea dintre vârsta maternă crescută în momentul concepţiei şi incidenţa mare a trisomiilor la copii. Cel mai clar efect al vârstei materne a fost dovedit în sindromul Down (trisomia 21) dar efecte similare au fost identificate şi în cazul trisomiilor 13 şi 18. În locul graficelor şi tabelelor care ilustrează în literatura de efectul vârstei materne asupra frecvenţei naşterilor cu trisomii autosomale, preferăm să subliniem că *riscul de nedisjuncţie* este:

- 1 la 1000 pentru femeile gravide în vârstă de ≤ 25 de ani;
- 1 la 100 la vârsta de 37 de ani;
- 1 la 10 la vârsta de 45 de ani

La aceste date mai adăugăm faptul că 92% din cazurile de trisomie 21(cea mai frecventă boală cromosomică) sunt produse prin nedisjuncţie maternă în meioza I. Efectul vârstei materne, ca factor predispozant la nedisjuncţie, este sigur şi - foarte probabil – vîrsta se corelează cu

particularităţile meiozei materne[21], care (printre altele) blochează ovocitele timp de câteva decade în profaza meiozei I („ovulele au vârsta femeii"). Studiile de genetică moleculară au permis formularea a trei ipoteze despre cauzele primare ale nedisjuncţiei, corelată cu vîrsta maternă:

- sinapsa prelungită între cromosomii omologi în meioza I (datorită recombinărilor intracromsomice localizate exclusiv centromeric sau telomeric) „trage" ambii cromosomi în aceeaşi celulă fiică;
- separarea precoce a cromatidelor surori (în M II) ca o consecinţă, probabilă, a reducerii ratei recombinărilor intracromosomice;
- anomalii ale fusului de diviziune.

Nedisjuncţia are probabil şi alte cauze decât vârsta maternă reproductivă avansată, deoarece numai 25% din cazurile de sindrom Down se nasc din femei peste 35 de ani. În ciuda cercetărilor intense, nu există nici-o dovadă ştiinţifică care să susţină rolul posibil al unor factori externi (infecţii virale, radiaţii, medicamente, hormoni, contraceptive, cafea sau fumat, reducerea frecvenţei raporturilor sexuale etc. De asemenea, la om este foarte probabil că nu intervin factori genetici (mutaţii ale unor gene ce controlează disjuncţia). Totuşi nu trebuie să uităm că la alte specii nedisjuncţia este sub control genetic iar la om diferiţi cromosomi au rate diferite de trisomie în avorturile spontane (de exemplu, trisomia 16 reprezintă o treime din aceste avorturi). Oricum, controlul genetic al meiozei este încă departe de a fi elucidat

Cauzele anomaliilor cromosomice de structura par la prima vedere mai clare deoarece mecanismul lor clasic de producere implică ruperea cromosomilor şi reunirea anormală a capetelor cromosomilor rupţi. Deci agenţii ce rup cromosomii (numiţi şi „clastogeni") sunt cauzele primare ale anomaliilor structurale. În realitate, se acumulează continuu dovezi care arată ca intervenţia clastogenilor este minimă iar cele mai multe anomalii structurale, din celulele germinale sau somatice, se produc spontan foarte probabil prin erori de recombinare, fie prin recombinarea omologă nealelică sau ectopică (împerecherea *incorectă* a omologilor produce un crossing over *inegal*) fie prin recombinare neomologă (sinapsă între regiuni identice din cromosomi neomologi). În aceste condiţii, structura particulară a genomului uman pare a fi sursa principala a erorilor de recombinare si deci a anomaliilor structurale.

Revenim astfel la prima idee a acestei secţiuni; chiar dacă 95 % din produţii de concepţie anormali sunt eliminaţi ca avorturi spontane, *rata anomaliilor cromosomice la nou născuţii vii (> 1:120) este mai mare decât la alte specii.* De ce ? Nu există explicaţii clare pentru această situaţie; exceptând efectul vârstei materne, se poate spune că nu există, foarte probabil, factori genetici şi de mediu care să fie implicaţi semnificativ în producerea anomaliilor cromosomice. Poate că frecvenţa lor ridicată reprezintă „preţul pe care îl plătim pentru ceea ce am ajuns", pentru evoluţia noastră la *Homo sapines sapiens*, evoluţie care a generat anumite particularităţi structurale şi funcţionale ale genomului uman. *„Cert este că medicii şi publicul trebuie să se obişnuiască cu ideea că un anumit grad al perturbării reproducerii umane prin anomalii cromosomice este...normal, iar eliminarea unui fetus anormal cromosomic este o selecţie naturală...binevenită" (Dorothy Warburton, 1997).*

D. POLIMORFISMELE GENETICE

Două genomuri umane alese la întâmplare sunt identice între ele în proporţie de 99,9%. Restul de 0,1% conţine variante genetice sau versiuni diferite (*alele*) ale unei secvenţe de ADN, situată într-o anumită poziţie (*locus*) din cromosomi, şi care ar rezultat în urma unor mutaţii. Când anumite variante genetice – alele – sunt frecvente şi se găsesc la mai mult de 1 % din populaţia generală, atunci ele se constituie ca **polimorfisme genetice**. În contrast, alelele cu o frecvenţă mai mică decât 1% sunt numite, prin convenţie, **variante rare**. Aceste denumiri au fost alese pentru a permite diferenţierea lor de *mutaţii*, termen care implică *per se*

[21] S-a discutat şi reducerea competenţei „imunologice" dintre mamă şi făt odată cu creştere vârstei materne, fapt ca ar permite supravieţuira embrionilor trisomici; lipsesc probe pentru această ipoteză.

un efect negativ asupra proteinei şi, respectiv, asupra caracterului fenotipic corespunzator, deşi mecanismul de producere este similar. In prezent exista tendinţa unificării tuturor acestor termeni sub denumirea largă de **variante genetice**.

Polimorfismele genetice sunt responsabile pentru cea mai mare parte din diversitatea şi individualitatea fenotipică observată în cadrul speciei umane. Aceste variaţii genetice pot fi localizate oriunde în genom, atât în interiorul genelor, cât şi în regiunile intergenice. Evident, numai acele polimorfisme existente la nivelul genelor au potenţialul de a asocia modificări fenotipice. De aceea, primele polimorfisme genetice au fost identificate indirect, prin studiul variaţiilor existente la nivelul proteinelor codificate. Ulterior a devenit însă clar că acest fenomen este mult mai amplu, deoarece toate polimorfismele rezultă, în ultimă analiză, prin modificări în secvenţa ADN. Dincolo de interesul teoretic, mai ales în studiile de genetică populaţională (vezi capitolul 7), identificarea sistematică a polimorfismelor umane s-a dovedit a avea numeroase aplicaţii practice; vom menţiona doar utilizarea lor

- în transfuzii sanguine şi transplante,
- identificarea de persoane,
- stabilirea paternităţii,
- diagnosticul genotipic indirect prin folosirea unor markeri genetici.

1. POLIMORFISME PROTEICE

Primele informaţii privind diversitatea genetică dintre indivizii umani au fost obţinute prin studiul variantelor proteice existente în populaţie. Primele polimorfisme au fost identificate încă de la începutul secolului trecut prin analiza aşa-numitelor antigene de grup sanguin, precum cele din sistemele ABO şi Rh. Ulterior au fost evidenţiate şi alte polimorfisme antigenice, prin studiul unor sisteme mai rare de grup sanguin (MNSs, Lutheran, Lewis, Xg etc) şi, mai recent, a sistemului HLA, considerat cel mai polimorfic sistem genetic uman (vezi capitolul 16). Prin studiul mobilităţii electroforetice, activităţii enzimatice şi a diferitelor proprietăţi fizico-chimice s-a evidenţiat polimorfismul unor proteine serice (haptoglobina, transferina, alfa-1-antitripsina, imunoglobulinele, ceruloplasmina etc), al unor enzime eritrocitare (fosfatza acidă-1, G6PD, esteraza D, fosfoglucomutaze), serice (colinesteraza-1, TGP, etc), tisulare (alcool dehidrogenaza, acetil-transeraza hepatică, etc)

A devenit astăzi clar că doi indivizi aleşi la întâmplare din populaţia generală pot prezenta diferenţe structurale la nivelul a circa 20% din totalul proteinelor. Cu cât indivizii sunt mai îndepărtaţi din punct de vedere genetic (grupuri etnice diferite), cu atât gradul de diversitate este mai pronunţat. Toate sistemele genetice polimorfice se găsesc în populaţie în mai multe variante; un individ posedă însă numai o anumită variantă dintr-un sistem. Datorită numărului mare de sisteme polimorfice (>30) si de variante în fiecare sistem, se pot realiza un număr imens de combinaţii şi fiecare individ posedă o combinaţie specifică de variante, este un unicat biologic. Se poate presupune firesc faptul că fiecare persoană de pe această planetă (exceptând gemenii monozigoţi) are o structură genetică unică. Aceste date au demonstrat fără echivoc conceptul de *"individualitate chimică"* emis de către Sir Archibald Garrod cu un secol în urmă. Înţelegerea individualităţii genetice şi biologice este piatra fundamentală a abordării genetice în medicina practică, exprimată prin dictonul: *"nu există boli ci numai bolnavi"*.

Având în vedere valoarea istorică cât şi valoarea practică deosebită, vom prezenta, succint, în continuare câteva elemente care stau la baza diversităţii sistemelor de grup sanguin ABO şi Rh şi a proteinei serice alfa$_1$-antitripsină.

1.1. POLIMORFISMUL SISTEMULULUI DE GRUP SANGUIN ABO

Sistemul de grup sanguin ABO a fost descris pentru prima dată de către Landsteiner în 1900 iar premiul Nobel pe care l-a primit se justifică prin rolul major pe care îl are sistemul ABO în transfuziile de sânge şi transplanturile de organe.

Landsteiner a descris patru "tipuri" de sânge la om determinate de prezenţa pe suprafaţa eritrocitelor a antigenelor A şi B şi a anticorpilor corespunzători anti-A şi anti-B în ser. Există patru fenotipuri majore: O, A, B şi AB: tipul A este caracterizat prin prezenţa antigenelor A şi a anticorpilor anti-B, tipul B prin prezenţa antigenelor B şi a anticorpilor anti-A, tipul AB prin prezenţa ambelor antigene şi absenţa celor doi anticorpi, iar tipul O prin absenţa antigenelor şi prezenţa celor doi anticorpi. Datorită acestui tip de corelaţie între antigene şi anticorpi, transfuziile de sânge se recomandă a se efectua numai izogrup.

Bazele moleculare ale sistemului de grup ABO au început a fi înţelese relativ recent. Antigenele de grup ABO sunt de fapt molecule de glicoproteine care sunt ataşate la suprafaţa eritrocitară. Ceea ce determina diferenţa dintre antigene este nu componenta proteică, care este relativ identică, ci o serie de grupări glucidice ataşate (vezi capitolul 4.B.5. şi figura 4.11). Prima etapă în formarea acestor antigene este rezultatul intervenţiei unei enzime numită *fucozil transferaza* (codificata de gena *FUT1* localizată pe cromosomul 19) care determină adiţia unor grupări de fucoză la miezul proteic. Rezultatul acestei etape este formarea antigenului H. Etapa a doua este catalizată de enzima *glicozil transferaza* (codificată de gena *ABO* de pe cromosomul 9) care prezintă în populaţia generală doua variante alelice majore, codominante, A şi B şi o variantă recesivă, O. Varianta alelică A determină adiţia la antigenul H a unui rest de N-acetilgalactozamină, cu formarea antigenului A, în timp ce varianta alelică B are afinitate mai crescută pentru adiţia unui rest de D-galactoză, ceea ce transformă antigenul H în antigen B. La persoanele de grup sanguin O glicozil transferaza nu este funcţională şi, ca urmare, eritrocitele vor prezenta pe suprafaţa lor antigene H.

Au fost identificate şi persoane care prezintă mutaţia homozigotă a genei *FUT1*. Aceşti indivizi nu sunt capabili să realizeze prima etapă în formarea antigenelor de grup *ABO* şi, ca urmare, indiferent că din punct de vedere genetic prezintă sau nu alele A şi/sau B ale glicozil transferazei, ele nu vor putea conduce la formarea antigenelor A şi B (fenotip Bombay). Aceşti indivizi prezintă în ser anticorpi anti-A şi anti-B şi, ca urmare, din punct de vedere serologic nu pot fi diferentiaţi de indivizii cu grup O. Analiza genetică a indivizilor cu grup Bombay a evidenţiat aspectul omogen, cu prezenţa aceleiaşi mutaţii punctiforme T725G care inactivează *FUT1*, asociată cu deleţia genei invecinate *FUT2* care este responsabilă de secreţia antigenelor de grup sanguin în salivă (caracterul secretor).

Odata cu clonarea genei glicozil transferazei a putut fi analizat substratul molecular al diferenţelor care există între alelele A, B şi O. Între secvenţa alelelor A şi B există o diferenţă de patru nucleotide care produc modificări de secvenţă a aminoacizilor ce modifică specificitatea glicozil transferazei codificată de gena *ABO*. Alela O are deleţia unei perechi de baze care produce o mutaţie cu schimbarea cadrului de lectură ce suspendă activitatea transferazei mutante. Deci micile modificări genetice conduc la substituţia unor aminoacizi din structura enzimei, care vor determina modificarea afinităţii pentru resturile glucidice. In fapt au fost evidenţiate numeroase subgrupuri sanguine precum A2, Ax sau B3 determinate de asemenea de diferenţe genetice la nivelul regiunilor codante şi producerea a peste 70 de alele. Se adaugă şi variaţii genetice la nivelul regiunilor reglatorii 5' si 3' precum şi numeroase variaţii genetice la nivelul intronilor.

1.2. POLIMORFISMUL SISTEMULUI DE GRUP SANGUIN Rh

Denumirea sistemului Rh provine de la maimuţele Rhesus care au fost utilizate în experimentele ce au dus la descoperirea sistemului de către Diamond şi Blackfan în 1932. Sistemul Rh este important pentru rolul sau în transfuziile de sânge şi în boala hemolitică a noului născut. Din punct de vedere fenotipic populaţia generală este împărţită în două categorii majore: indivizi Rh pozitivi care exprimă pe suprafaţa eritrocitelor antigenul RhD (aproximativ 85% din populaţia caucaziană) şi indivizi Rh negativi care nu exprimă acest antigen (15%). Spre deosebire de sistemul ABO indivizii Rh negativi nu prezintă spontan anticorpi anti RhD în ser. În schimb, aceşti anticorpi se pot dezvolta ca urmare a contactului cu sângele Rh pozitiv care determină imunizarea invivizilor respectivi. Acest proces are o

semnificaţie deosebită în cazul transfuziilor de sânge şi în cazul bolii hemolitice a nou-născutului.

Boala hemolitică a nou-născutului este o afecţiune care poate apărea la copii Rh pozitivi născuţi din mame Rh negative. În mod normal, în cursul sarcinii, mici cantităţi de sânge fetal pot traversa bariera placentară determinând imunizarea mamei Rh negative. Anticorpii materni necesită un interval de timp pentru formare, astfel încât, de regulă, prima sarcina decurge fără probleme. Atunci când mama a fost imunizată anterior primei sarcini, sau în cursul unei a doua sarcini cu feţi Rh pozitivi, anticorpii anti RhD de la mamă pot traversa bariera placentară către făt, în special spre sfârşitul sarcinii, determinând hemoliza eritrocitelor fetale. Rezultatul este icterul pronunţat şi, în formele severe, insuficienţa cardiacă congestivă. Afecţiunea poate fi prevenită în prezent prin administrarea la femeile Rh negative de imunoglobuline împotriva anticorpilor anti-RhD după fiecare sarcină cu făt Rh pozitiv.

Studiile de genetică au evidenţiat faptul că sistemul Rh este unul dintre cele mai polimorfice sisteme de grup sanguin, cu peste 45 de antigene independente. Există trei gene majore care sunt implicate în producerea acestui sistem: gena *RHD* ce codifică proteina RhD (purtătoare a antigenului RhD) şi gena *RHCE* care codifică proteina RhCcEe (purtătoare a antigenelor C sau c si E sau e) sunt localizate pe braţul scurt al cromosomului 1, în timp ce gena *RHAG* (*Rh associated glycoprotein*) este localizată pe cromosomul 6p. Proteinele Rh poartă antigenele Rh, dar sunt exprimate pe suprafaţa eritrocitelor numai dacă proteina RhAG este de asemeni prezentă. La toate acestea se adaugă şi o serie de proteine Rh accesorii şi toate împreună formează "complexul Rh". Indivizii Rh pozitivi prezintă antigenul major al acestui sistem, RhD. Indivizii Rh negativi prezintă de regulă o deleţie a întregii gene RHD. În schimb, diferenţele care există între alelele C şi c, respectiv E şi e sunt rezultatul unor polimorfisme mononucleotidice care conduc la substituţia unor aminoacizi în structura proteinei RhCcEe.

1.3 POLIMORFISMUL ALFA1 –ANTITRIPSINEI.

Alfa1-antitripsina este o proteină serică importantă cu acţiune inhibitoare asupra unor enzime proteolitice specifice cum sunt: tripsina, chimotripsina sau elastaza pancreatică. Ţinta sa principală este elastaza leucocitară, enzimă care în lipsa inactivării de către alfa1-antitripsină, distruge proteinele ţesutului conjunctiv pulmonar, în special elastina, determinând dezorganizarea alveolelor pulmonare. Deficienţa în alfa1-antitripsină produce o formă severă de emfizem pulmonar (boală pulmonară cronică obstructivă), cu debut precoce.

Locusul genei care codifică alfa1-antitripsina, cunoscut sub numele de PI (protease inhibitor) este situat la nivelul cromosomului 14 şi prezintă un înalt polimorfism. Unele variante alelice sunt mai frecvente în populaţie (10-75%), altele mai rare. Cele mai frecvente alele (M1, M2, M3) codifică variante proteice diferite structural dar cu funcţie normală. Alte alele rare (Z şi S) specifică variante proteice cu activitate inhibitorie proteazică semnificativ redusă, ceea ce duce la apariţia unor manifestări clinice.

Commented [A1]: De adaugat o completare privind clusterul serpinelor si, la sfârşit agregarea hepatică precum si mutaţia ce determină alterarea coagulării; vezi Wilson, paginile 173-174

Principala semnificaţie medicală a polimorfismului alfa1-antitripsinei este legată de alelele care determină o deficienţă în sinteza şi activitatea acestei proteine. Cea mai importantă dintre acestea este alela Z, având o frecvenţă de 1-2% în populaţie. Indivizii cu genotip Z/Z prezintă o concentraţie plasmatică mult mai redusă (circa 15%) şi un risc crescut de boală pulmonară obstructivă, instalată la adultul tânăr, astm bronşic, ciroză hepatică[22]. Deficienţa alfa1-antitripsinei prezintă frecvenţe diferite în populaţie, de la aproximativ 1/2000 - 1/8000 în populaţia caucaziană la frecvenţe mult mai reduse în populaţia de culoare şi la asiatici. Şi alte variante genotipice, cum ar fi statusul heterozigot pentru alelele S sau Z pot avea semnificaţie clinică, determinand predispoziţie pentru afectare pulmonară mai ales la fumători.

2. POLIMORFISME ADN

[22] Mecanismul afectării hepatice, diferit de afectarea pulmonară, implică agregarea şi stocarea proteinei Z în reticulul endoplasmic, datorită structurii sale modificate

Dupa cum am precizat anterior, analiza la nivel proteic permite identificarea numai a unei minorităţi a polimorfismelor genetice şi anume a acelora care determină modificarea secvenţei aminoacizilor. Însă în interiorul genelor există "variaţii genetice sinonime", care nu pot fi identificate pe baza modificărilor fenotipice. În plus, variaţii de secvenţă nucleotidică a unor segmente/regiuni de ADN există şi în regiunile intergenice iar frecvenţa acestor polimorfisme intergenice o depăşeste de regulă pe cea din interiorul genelor, deoarece în acest caz nu există nici o presiune de selecţie. Există mai multe tipuri de polimorfisme ADN. Cea mai simpla formă este reprezentată de polimorfismele mononucleotidice (SNP – *single nucleotide polymorphism*). Acestora li se adaugă polimorfismele existente la nivelul unor repetiţii nucleotidice simple (de la unul până la şase nucleotide) care intră în componenţa *microsateliţilor* sau polimorfismele prezente la nivelul *minisateliţilor*. Toate aceste tipuri de variaţii în secvenţa ADN se corelează cu polimorfismul lungimii fragmentelor de restricţie

2.1 POLIMORFISMUL LUMGIMII FRAGMENTELOR DE RESTRICŢIE

Enzimele de restricţie (vezi capitolul 3.C.1.1) recunosc o secvenţă nucleotidică specifică şi secţionează ADN la acest nivel. Clivarea moleculei de ADN cu o anumită enzimă de restricţie "fragmentează" ADN într-un număr definit de fragmente, de o anumită lungime, corespunzătoare distanţei dintre două situsuri de restricţie. Modificările de secvenţă nucleotidică care vor produce *abolirea* unui situs de restricţie, *crearea* unui situs nou sau schimbarea "distanţei" dintre două situsuri (prin deleţie sau inserţie nucleotidică) vor modifica lungimea fragmentelor de restricţie (acestea sunt evidenţiate prin Southern blot, după hibridarea cu o sondă corespunzătoare unei părţi din fragmentul respectiv, vezi 3.C.3.1) (figura 6.35). Aceste variaţii ale ADN au fost numite polimorfisme ale lungimii fragmentelor de restricţie – **RFLPs** (de la *restriction fragment length polymorphisms*; se pronunţă "*reflips*"). Fragmentele de lungimi diferite constituie *alele codominante* ale locusului ADN respectiv. În practică, RFLPs se folosesc în diagnosticul genotipic indirect deoarece anumite alele ale unui locus marker se pot transmite strâns înlănţuite cu o alelă mutantă (vezi capitolul 9).

2.2 POLIMORFISMELE MONONUCLEOTIDICE (SNP)

SNP reprezintă forma cea mai frecventă a polimorfismelor ADN (în medie 1 la 1000 baze, dar frecvenţa poate fi mai înaltă în anumite regiuni precum insulele CpG – 1 la 100 sau mai redusă în interiorul unor gene – 1 la 2500 baze). SNP situate în regiunile intergenice sau cele sinonime din cadrul genelor nu sunt supuse selecţiei naturale. Pe de altă parte, modificarile nonsinonime pot fi supuse unor asemenea efecte, iar persistenţa lor în populaţie poate reflecta o serie de avantaje selective şi poate explica o bună parte din diversitatea fenotipică existentă în populaţia umană. Având în vedere acest fapt s-au depus eforturi considerabile pentru cartografierea şi caracterizarea acestor polimorfisme.

In anul 2001 o serie de organizaţii publice şi private precum Celera Genomics, Incyte Genomics, Sanger Institute şi Washington University au iniţiat un proiect comun de realizare a unei hărţi a acestor SNP la nivelul întregului genom. La aceasta s-au adaugat eforturile International SNP Map Working Group (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) care au condus la identificarea până în prezent a cira 3 milioane SNP.

Există numeroase metode de identificare a SNP. Cu valoare istorică se poate menţiona tehnica RFLP care permite evidenţierea efectului indirect pe care asemenea SNP îl pot avea asupra unor situsuri de restricţie ale enzimei utilizate (apariţia sau anularea unor situsuri de restricţie determină lungimi diferite ale fragmentelor ADN în urma digestiei ADN genomic cu o enzimă de restricţie). Utilizarea enzimelor de restricţie permite însă acoperirea unei mici părţi (sub 5%) din întreaga secvenţă a ADN uman şi, de aceea, a fost necesară dezvoltarea unor tehnici noi, precum electroforeza in gel cu gradient denaturant (DGGE), analiza heteroduplexurilor, microcipuri şi secvenţializarea.

Studiul SNP este utilizat în prezent în câteva direcţii majore:

- Localizarea genelor de susceptibilitate pentru caracterele multifactoriale (vezi tabelul 6.8) bazată pe studii de dezechilibru ale înlănţuirii şi studii de asociere a haplotipurilor (vezi capitolul 3.D).

Tabelul 6.8 Exemple de boli asociate cu unele SNP

Boala	Gena	Proteina codificata
Astmul bronsic	EDN1 NOS1	Endotelina 1 Nitric oxid sintetaza 1
Aritmiile cardiace	KCNQ1	Proteina canal de potasiu
Artrita idiopatică	MIF	Factorul de inhibare a macrofagelor
Cancerul pulmonar	MMP1	Metaloproteinaza matriceala 1
Ciroza biliară	MBL	Proteina de legare a manozei
Diabetul zaharat tip II	STX1A	Sintaxina 1A
Hipertensiunea arterială	TAF1	Inhibitorul fibrinolizei activat de trombina
Lupusul eritematos sistemic	PRL	Prolactina
Migrena	INSR	Receptorul insulinic

- Farmacogenetica care încearcă sa individualizeze tratamentul fiecarui pacient în funcţie de individualitatea sa genetică. Un rol major în aceste studii îl are în special identificarea şi înţelegerea efectelor pe care asemenea SNP le au asupra modularii activităţii enzimelor implicate în metabolizarea medicamentelor.
- Cercetarile privind evoluţia speciei umane din punct de vedere biologic (similitudinea cu alte specii) şi istoric (migraţia populaţiilor).

2.3 POLIMORFISMELE MICROSATELIŢILOR ŞI MINISATELIŢILOR ADN

Aceste polimorfisme ADN au fost prezentate deja în capitolul 2.C.

Minisateliţii (numiţi şi VNTR – *variable number of tandem repeat*) sunt reprezentaţi de multiple copii (ale unei secvenţe de 10-100 nucleotide, numită *minisatelit*) care sunt dispuse în tandem, între două situsuri de restricţie. Unii minisateliţi sunt extrem de polimorfici, putând prezenta în populaţia generală câteva zeci de alele, diferite prin numărul de repetiţii şi deci mărimea fragmentului de restricţie în care se află minisatelitul.

Deoarece *secvenţa de bază* (“miezul”) a unui minisatelit poate fi adeseori destul de asemănătoare la nivelul a numeroşi loci, aceasta a permis dezvoltarea unor tehnici care fac posibilă analiza simultană a mai multor loci folosind o singură sondă. Se realizează un model de distribuţie caracteristic unei anumite persoane, cunoscut sub numele de **amprenta ADN** (*DNA fingerprinting*). În principiu ADN genomic este supus digestiei cu o enzima de restricţie după care este utilizată metoda Southern blot în care un fragment minisatelitic este utilizat drept sondă (vezi figura 6.35).

Microsateliţii reprezintă secvenţe repetitive simple, cele mai frecvente forme fiind repetiţiile dinucleotidice, trinucleotidice şi tetranucleotidice care apar în medie cu o frecvenţă de 1 la fiecare 10 kb. Microsateliţii umani au un grad crecut de polimorfism, cu circa 10 alele diferite per locus în populaţie, ceea ce face ca gradul de heterozigozitate pentru majoritatea acestora să depăşească 80%. Această caracteristică a permis utilizarea lor în alcătuirea primelor hărţi genomice. De asemenea înlănţuirea genetică a unor microsateliţi cu o anumită genă este utilizată pentru diagnosticul indirect al purtătorilor unor mutaţii cauzatoare ale unor boli genetice.

2.4. APLICAŢIILE PRACTICE MEDICALE A POLIMORFISMELOR ADN

Polimorfismele genetice sunt amplu folosite în toate cercetările de genetică medicală deoarece permit diferenţierea diferitelor alele ale unei gene sau a diferitelor segmente de ADN genomic. Calitatea de markeri genetici a fost utilizată pentru cartografierea genică prin analize

de înlănţuire, diagnosticul prenatal sau presimptomatic al unor boli genetice,depistarea heterozigoţilor purtători de gene recesive, identificarea persoanelor cu risc crescut sau scăzut pentru anumite boli comune ale adultului, tipare tisulară pentru transplante de organe, teste de paternitate, identificare persoanelor.

INTERNET

1. *Anomaliile cromosomice constituţionale:* http://www.pathology.washington.edu:80/Cytogallery
2. *Bază de date privind cromosomii umani:* http://www.kumc.edu/gec/geneinfo.html
3. *Bază de date pentru mutaţiile umane: HUGO database:* http://www.ariel.ucs.unimelb.edu.au
   Institute of Medical Genetics in Cardiff: http://www.archive.uwcm.ac.uk.
4. *Citogenetică moleculară:* http://bioserver.uniba.it/fish/Cytogenetics/welcome.html
5. *Genetică medicală -* http://www.hslib.washington.edu-helix
6. *Genetică medicală - University of Utah School of Medicine:* http://medgen.genetics.utah.edu
7. *Gene amprentate;* http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting
8. *National Human Genome Research Institut:* http://www.nhgri. nih.gov.
9. *Nomenclatura mutaţiilor:* http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/
10. *Nomenclatura genelor:* http://www.gene.ucl.ac.uk/cgi-bin/nomenclature/searchgenes.pl
11. *Polimorfismele SNP:* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
12. *Structura normală şi anomaliile cromsoomice:* http://www.tokyo~med.ac.jp

Bibliografie specifică selectivă

1. Antonarakis S.E. – *Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations*- Hum.Mutat. 1998;11:1-3
2. Avent N.D., Reid M.E - *The Rh blood group system* – Blood, 2000;95: 375-387.
3. den Dunnen, J.T. and Antonarakis, S.E.- *Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion* - Hum. Mut. 2000;15:7-12.
4. D'Andrea A.D., Grompe M. - *The Fanconi anaemia/BRCA pathway* - *Nat Rev Cancer*, 2003, 3:23-34.
5. Bishop A. J.R., Schiestl R.H. - *Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects* - Hum. Mol. Genet., 2000;9,2427-2434
6. Dasika G. K. et al. - *DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis* - Oncogene, 1999;18:7883-7899
7. Engel E. – *Uniparental disomy, genomic imprinting and a case for new genetics* – Ann.Genet, 1997;40:24-34
8. Haber J. E. - *Partners and pathways: repairing a double-strand break* - Trends Genet., 2000;16:259-264.
9. Harfe B. D., Jinks-Robertson S. - *DNA mismatch repair and genetic instability* - Annu. Rev. Genet., 2000;34:359-399
10. Hendrickson E.A. - *Cell-Cycle Regulation of Mammalian DNA Double-Strand-Break Repair* - Am.J.Hum.Genet 1997;61:795-800.
11. Hoeijmakers J.H. - *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer* - Nature, 2001;411:366-374.
12. Inoue, K. and Lupski, J.R. - *Molecular mechanisms for genomic disorders* - Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2002;3:199-242.
13. Jeffrey A.J. – *DNA typing: approaches and applications* – J.Foresnic Sci.Soc. 1993;33:204-211
14. Kazanian H.H, Moran J.V. - *The impact of L 1 retrotransposons on the human genome* - Nature Gen. 1998; 19:19-23
15. Khanna K. K. - *Cancer Risk and the ATM Gene: a Continuing Debate* - J. Natl. Cancer Inst., 2000;92: 795-802
16. Latchman D.S. - *Transcription-factor mutations and disease* - N.Engl.J.Med 1996; 334:28-33.
17. Ledbetter DH, Ballabio A. – *Molecular Cytogenetics of contiguous gene syndrome* – in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) – *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 7th ed, McGraw-Kill, 1995, New York, pp811-839
18. Lindahl T., Wood R. D. - *Quality Control by DNA Repair* - Science, 1999;286:1997-2005
19. Lupski JR. – *Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits* – Tends Genet. 1998;14:417-422
20. Minnick D.T., Kunkel T.A. – *DNA synthesis errors, mutators and cancer* - Cancer Survey, 1996;28: 3-20.
21. Peltomaki P. – *Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer* – Hum.Mol.Genet., 2001;10:735-740

22. Petes T.D. - *Meiotic recombination: hot spots and cold spots* - Nat. Rev. Genetics, 2001;2: 360-369
23. Petronczki M, Simos MF, Nasmyth K- *Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis* - Cell, 2003;112: 423-440
24. Preston J.R. – *Aneuploidyin germ cells: disruption of chromosome mover components* – Env.Mol.Mutagenesis 1996;28:176-181
25. Richards, R.I. - *Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeates in human genetic disease*- Hum. Mol. Genet. 2001;10: 2187-2194.
26. Roeder G.S.- *Meiotic chromosomes: it takes two to tango* - Genes Dev., 1997;11: 2600-2621
27. Sancar A. – *DNA Repair in humans* - Annu.Rev. Genetics, 1995;29:69-105.
28. Shastry B.S. - *SNP alleles in human disease and evolution* - J. Hum. Genet., 2002;47: 561-566.
29. Vidau M. - *Mécanismes et conséquences des mutations génétiques* - Rev Prat. 1997; 47:146-154.
30. Zhou B. B. S., Elledge S. J. - *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective* - Nature, 2000;408:433-439
31. Wang DG, Fan J, Siao C et al – *Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotid polymorphisms in the human genome* – Science, 1998;280:1077-1082
32. Weaver D.T. – *Regulation and repair of double-strand DNA breaks* – Critical Rev.Eukar.Gene Expression , 1996, 6:345-375
33. Wheeler J. M. D., Bodmer W. F., Mortensen N.J. - *DNA mismatch repair genes and colorectal cancer* - Gut, 2000;47:148-153
34. Yip S.P. - *Sequence variation at the human ABO locus* - Ann. Hum. Genet., 2002;66:1-27.
35. Youssoufian, H. and Pyeritz, R.E. - *Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans* - Nat. Rev. Genet. 2002;3: 748-758.

CAPITOLUL 7

GENETICA **POPULAŢIILOR**

Genetica medicală se preocupă nu numai de stabilirea unui diagnostic corect al bolii unui pacient, dar şi de evaluarea riscului de recurenţă a afecţiunii la rudele sale. În această acţiune, specifică geneticii medicale, trebuie luate în considerare atât frecvenţa genelor mutante cât şi genotipurile persoanelor din populaţia generală care se căsătoresc cu membrii familiei bolnavului. Prin urmare, în genetica medicală, la evaluarea unui pacient, se va ţine cont atât de familie sa cât şi de populaţia căreia îi aparţine.

A. FRECVENŢA GENELOR ŞI GENOTIPURILOR ÎNTR-O POPULAŢIE

1. DEFINIŢIA ŞI OBIECTIVELE GENETICII POPULAŢIILOR

Prin **populaţie** se înţelege un grup (o comunitate) de indivizi cu o constelaţie comună de gene, care trăiesc în acelaşi habitat şi se împerechează la întâmplare (în panmixie), fără selecţia partenerilor de sex opus, pentru a produce descendenţi.

Fiecare organism primeşte de la părinţii săi, prin genele gameţilor, informaţiile necesare pentru formarea şi dezvoltarea sa. În acest mod, membrii unei populaţii umane moştenesc şi transmit gene asemănătoare. Totalitatea genelor existente la un moment dat în populaţie alcătuiesc constelaţia sau **fondul comun de gene** ("*gene pool*" în limba engleză). Indivizii reprezintă *"asocieri temporare şi specifice (unice) ale unor gene"* din constelaţia de gene caracteristică populaţiei. Din acest punct de vedere populaţia biologică este mai curând *"o populaţie de gene"* decât un grup de indivizi; populaţiile pot fi deci descrise în termeni de frecvenţă a diferitelor gene alele şi genotipuri, care generează anumite fenotipuri.

De exemplu, în populaţia britanică frecvenţa relativă a genotipurilor grupului sanguin MN este următoarea: *M/M* -28%, *NN* – 22% şi *M/N* – 50%.

Grupele şi subgrupele populaţionale se deosebesc unele de altele prin constelaţia specifică (fondul) de gene, determinată de frecvenţele diferite ale alelelor multor loci.

Exemplele sunt numeroase dar deocamdată vom menţiona doar câteva:

- în sistemul polialelic al grupului sanguin ABO, alela B predomină în populaţia asiatică şi frecvenţa ei scade de la est spre vest; alela A predomină în vestul Europei, iar alela O în populaţia africană;
- sicklemia este frecventă în Africa, mucoviscidoza predomină în populaţia albă din Europa şi SUA, deficienţa în aldehid dehidrogenază 1 este comună în populaţia asiatică; boala Tay Sachs are o frecvenţă ridicată la grupurile de evrei Ashkenazi; coroideremia este comună în Finlanda; distrofia miotonică în Quebec, etc.

În populaţie, genele formează numeroase combinaţii care interacţionează şi se influenţează reciproc. Între gene se stabilesc relaţii alelice şi nonalelice care fac ca ansamblul lor să fie integrat (coadaptat). Acest fapt conferă constelaţiei genice a populaţiei *o puternică coeziune*. Împerecherea întâmplătoare (panmictică) a indivizilor din populaţie produce un schimb permanent de gene, care, printr-o continuă recombinare şi segregare meiotică, generează la descendenţi o heterozigoţie perpetuă şi masivă. Această mare bogăţie genotipică determină în populaţie *o intensă variabilitate genetică*. Ea explică unicitatea genetică a fiecărei persoane şi

vigurozitatea, adaptabilitatea şi vitalitatea populaţiei. Exceptând parţial omul, la celelalte specii individul are un rol neînsemnat în evoluţie; rolul decisiv revine populaţiei aceasta reprezentând unitatea majoră a evoluţiei. Populaţia biologică este deci o populaţie de gene, o unitate de reproducere panmictică şi o unitate de evoluţie.

Genetica populaţiior umane *studiază frecvenţa genelor şi proporţiile relative ale diferitelor genotipuri în interiorul unei populaţii, precum şi factorii care menţin sau modifică frecvenţa lor de la o generaţie la alta*. Evaluarea acestor parametri este utilă pentru:

- definirea structurii genetice caracteristice populaţiei respective, prin frecvenţa specifică a unor gene mutante şi boli genetice; existenţa unor alele mutante specifice unei populaţii are importanţă pentru înţelegerea originii bolilor genetice şi furnizează informaţii utile pentru diagnosticul bolii în populaţiile cu risc crescut;
- sfatul genetic, prin cunoaşterea frecvenţei diferitelor genotipuri în populaţie; de exemplu, evaluarea incidenţei heterozigoţilor sănătoşi purtători ai unei gene recesive (Na) şi calcularea riscului de apariţie în descendenţă a unor copii afectaţi (aa);
- aprecierea necesităţilor medico-socio-economice prin evaluarea frecvenţei genotipurilor anormale în populaţie; de exemplu, evaluarea rentabilităţii programelor de depistare genetică într-o anumită populaţie.

Genetica populaţiilor are multe elemente comune cu epidemiologia care studiază interrelaţiile dintre factorii genetici şi de mediu, determinante ale frecvenţei şi distribuţiei bolilor în colectivităţile umane. Cele două domenii formează împreună **epidemiologia genetică** care se ocupă îndeosebi de bolile multifactoriale, frecvente în viaţa adultului.

2. LEGEA HARDY-WEINBERG

Conceptul cel mai important în genetica populaţiilor este legea descrisă în 1908 de către Hardy şi Weinberg. Această lege explică de ce într-o populaţie vastă, în interiorul căreia uniunile (împerecherile) sunt aleatorii (la întâmplare sau panmictice), *frecvenţele alelice nu variază* de la o generaţie la alta.

> Datorită raporturilor de dominanţă şi recesivitate care se stabilesc între genele alele ar fi de aşteptat ca frecvenţa fenotipurilor dominante să fie mai mare şi să crească pe seama celor recesive. Astfel, în medie, 3/4 din descendenţii a doi heterozigoţi (An+An) vor manifesta caracterul dominant şi numai 1/4 vor avea caracterul recesiv. În realitate, în populatiile mari şi panmictice aceste fenomene nu se observă şi populaţia este în stare de echilibru deoarece proporţia relativă a diferitelor genotipuri rămâne *constantă (stabilă)* de la o generaţie la alta.

Pentru a demonstra legea Hardy şi Weinberg presupunem că un anumit locus autosomal *"A"* are două gene alele *"A"* şi *"a"*. Dacă notăm cu *"p"* frecvenţa genei *"A"* şi cu *"q"* frecvenţa genei *"a"* atunci suma totală a alelelor locusului *A* într-o populaţie dată este $p + q = 100\%$. Deoarece frecvenţele aelice sunt exprimate de obicei ca o fracţie a unităţii, relaţia se poate scrie şi $p + q = 1$.

Cele două gene alele *"A"* şi *"a"* vor alcătui trei genotipuri: *AA, Aa* şi *aa*. Indivizii din populaţie posedă unul din aceste genotipuri. Ei vor produce gameţi ce conţin numai gena *"A"* sau *"a"*. Gameţii purtători ai acestor gene vor fi în aceeaşi proporţie – *p* şi *q* – ca şi frecvenţele alelice în populaţie. Prin unirea aleatorie (independentă de genotip şi de fenotip) a indivizilor şi deci a gameţilor masculini şi feminini ce conţin fie gena *"A"* fie gena *"a"* (cu frecvenţele *p* şi *q*) rezultă în descendenţă (F1) indivizi cu unul din următoarele trei genotipuri posibile: *AA, Aa, aa* (tabelul 7.1). Frecvenţele acestor genotipuri va fi p^2, $2pq$ şi q^2 fiind o extensie a binomului $(p+q)^2$, iar suma frecvenţelor lor egală cu 1. O populaţie în care distribuţia genotipurilor este binomială se află în *echilibru genetic*.

Tabel 7.1. Frecvenţa genotipuriilor realizată de alelele *A* şi *a* ale locusului autosomal *A*.

		Gameţi masculini	
		A *(p)*	*a* *(q)*
Gameţi feminini	*A* *(p)*	*AA* *(p^2)*	*Aa* *(pq)*
	a *(q)*	*Aa* *(pq)*	*aa* *(q^2)*
Frecvenţa totală a genotipurilor la descendenţi = $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$			

În generaţia următoare, fiecare din cele trei genotipuri paterne se poate asocia cu fiecare din cele trei genotipuri materne (tabelul 7.2). Genotipurile ce rezultă la descendenţi din fiecare uniune precum şi frecvenţa lor este prezentată în tabelul 7.3. Din aceste încrucişări rezultă descendenţi cu genotipurile *AA, Aa* şi *aa*. Frecvenţele lor (calculate pe baza datelor din tabelul 7.3) sunt p^2, $2pq$ şi q^2.

Tabel 7.2. Frecvenţa diferitelor încrucişări parentale

		Genotipuri paterne		
		AA *(p^2)*	*Aa* *(2pq)*	*aa* *(q^2)*
Geno-tipuri materne	*AA* *(p^2)*	*AA x AA* *(p^4)*	*AA x Aa* *($2p^3q$)*	*AA x aa* *(p^2q^2)*
	Aa *(2pq)*	*Aa x AA* *($2p^3q$)*	*Aa x Aa* *($4p^2q^2$)*	*Aa x aa* *($2pq^3$)*
	aa *(q^2)*	*aa x AA* *(p^2q^2)*	*aa x Aa* *($2pq^3$)*	*aa x aa* *(q^4)*

Tabelul 7.3. Frecvenţa diferitelor genotipuri la descendenţi

Încrucişări parentale		**Descendenţi**		
Tipuri	*Frecvenţă*	*AA*	*Aa*	*aa*
AA x AA	p^4	p^4	-	-
AA x Aa	$4p^3q$	$2p^3q$	$2p^3q$	-
AA x aa	$2p^2q^2$	-	$2p^2q^2$	-
Aa x Aa	$4p^2q^2$	p^2q^2	$2p^2q^2$	p^2q^2
Aa x aa	$4pq^3$	-	$2pq^3$	$2pq^3$
aa x aa	q^4	-	-	q^4
Total descen-denţi	***AA*** $= p^4 + 2p^3q + p^2q^2 = p^2(p^2 + 2pq + q^2) = p^2(p + q)^2 = p^2(1)^2 =$ $\mathbf{p^2}$			
	Aa $= 2p^3q + 2p^2q^2 + 2p^2q^2 + 2pq^3 = 2pq\,(p^2 + 2pq + q^2) = 2pq\,(p+q)^2 = 2pq(1)^2 =$ $\mathbf{2pq}$			

	$\boldsymbol{aa} = p^2q^2 + 2pq^3 + q^4 = q^2(p^2 + 2pq + q^2) = q^2(p + q)^2 = q^2(1)^2 = \boldsymbol{q^2}$

Se observă că frecvenţa fiecărui genotip (*AA, Aa, aa*) în generaţia a doua (F2) este aceeaşi (p^2, $2pq$, q^2) ca şi în prima generaţie; la fel se întâmplă şi cu frecvenţele genelor alele, deoarece $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, deci $(p + q)^2 = 1$ sau $p + q = 1$.

Pe baza datelor prezentate mai sus se poate enunţa legea Hardy-Weinberg: *"într-o populaţie panmictică cu efectiv nelimitat, frecvenţele iniţiale p şi q ale alelelor A şi a se menţin constante din generaţie în generaţie; acest lucru este valabil şi pentru frecvenţa genotipurilor AA, Aa, aa care vor fi în proporţie de $p^2 : 2pq : q^2$. O astfel de populaţie, cu frecvenţe genice stabile, este în stare de echilibru".*

Din demonstraţia şi enunţul legii se remarcă faptul că Hardy şi Weinberg au explicat baza frecvenţei constante a genelor ca o aplicaţie a teoremei binomiale $(p + q)^n$, unde *p* şi *q* sunt probabilităţile de producere a două evenimente alternative (cele două gene alele), iar *n* numărul alelelor pentru un locus dat[1].

O populaţie care demonstează relaţiile/caracteristicile de bază ale legii Hardy-Weinberg este considerată a fi în echilibru Hardy-Weinberg. Acest echilibru a fost clar demonstrat mai sus pentru un locus autosomal bialelic. Pentru un locus legat de X situaţia este puţin diferită în sensul că echilibrul nu se realizează după prima generaţie de încrucişări întâmplătoare; el este obţinut, într-o manieră oscilatorie, după un număr de generaţii întrucât transmiterea ereditară diferă la bărbaţi şi femei (bărbaţii moştenesc unicul X de la mamele lor şi îl transmit fiicelor; cromosomii XX de la femei provin însă de la ambii părinţi). Când se realizează echilibrul genic, el este menţinut în generaţiile următoare. În aceste condiţii, frecvenţa genică este aceeaşi la ambele sexe, frecvenţa bărbaţilor afectaţi (hemizigoţi X^aY) este egală cu aceea a genei alele mutante (X^a) în timp ce frecvenţele genotipice la femei (XX) sunt la fel ca şi în cazul unui locus autosomal.

Legea Hardy-Weinberg este valabilă numai în anumite condiţii:

- populaţiile sunt mari;
- încrucişările au loc la întâmplare şi nu există căsătorii preferenţiale sau consanguine;
- nu se produc mutaţii ale locusului analizat sau rata mutaţiilor este constantă (alelele mutante pierdute prin deces sunt înlocuite prin mutaţii noi);
- nu există selecţie faţă de un anumit fenotip; toate genotipurile unui locus au o viabilitate şi o fertilitate egală;
- nu se produc migraţii care să modifice structura genetică a populaţiei.

Aşa cum vom vedea, aceste condiţii nu sunt totdeauna realizate în toate populaţiile umane dar amploarea factorilor ce intervin este limitată, modificările frecvenţei genelor sunt echilibrate fie la nivelul iniţial, fie la un nou nivel. Astfel legea Hardy-Weinberg rămâne relativ valabilă şi poate fi aplicată în practica geneticii medicale, pentru a estima frecvenţele alelice.

3. APLICAŢIILE MEDICALE ALE LEGII HARDY-WEINBERG

3.1. OBŢINEREA UNOR DATE DESPRE FRECVENŢA GENICĂ UTILE PENTRU REALIZAREA SFATULUI GENETIC

În realizarea sfatului genetic şi deci pentru calcularea riscului genetic este util să cunoaştem genotipul unei persoane, în funcţie de datele sale familiale şi, în special, de gradul de rudenie cu un bolnav cu o afecţiune genetică, precum şi frecvenţa genotipurilor corespunzătoare în populaţia din care provine partenerul de cuplu a persoanei respective, calculate conform legii Hardy-Weinberg.

a. Boli autosomal dominante

În afecţiunile autosomal dominante frecvenţa (q^2) a homozigoţilor (*AA*) este foarte mică

---

1 În cazul unor alele multiple frecvenţele genice şi genotipice pot fi calculate prin adăugarea unui/unor noi termen(i) la ecuaţia binomială $(p + q)^2$. De ex. frecvenţele genice şi genotipice pentru cele trei alele ale locusului de grup sanguin ABO se vor calcula pe baza formulei $(p + q + r)^2$.

comparativ cu frecvenţa (*2pq*) a heterozigoţilor afectaţi (tabelul 7.5.); în aceste condiţii frecvenţa *q* a genei mutante dominante (*A*) este extrem de mică faţă de frecvenţa (*p*) a genei normale (*n*). De exemplu, în hipercolesterolemia familială frecvenţa bolnavilor homozigoţi (q^2) este 1 : 1.000.000, iar a celor heterozigoţi (*2pq*) ete 1 : 500. Frecvenţa (*q*) a genei mutante este 1 : 1.000 sau 0.001 iar frecvenţa (*p*) a genei normale este $p = 1 - q = 0{,}999$, deci aproximativ egală cu 1.

Pentru practica medicală se poate conchide că aproape orice pacient cu o boală autosomal dominantă este heterozigot (bolnavii homozigoţi pot fi excluţi din calcul) şi deci *frecvenţa bolii este aproximativ egală cu frecvenţa heterozigoţilor*. În acest caz, frecvenţa genei mutante dominante este jumătate din frecvenţa bolnavilor heterozigoţi (*2pq* sau *2q* deoarece *p*=1).

b. Boli autosomal recesive

Cunoscând frecvenţa (q^2) a bolnavilor (*aa*) se pot calcula frecvenţele (*q*) genei mutante recesive q = (frecvenţa bolnavilor)$^{1/2}$, frecvenţa (*p*) genei normale şi frecvenţa heterozigoţilor (*2pq*). De exemplu, frecvenţa (q^2) a bolnavilor cu mucoviscidoză în Europa este de circa 1/2500; rezultă că frecvenţa (*q*) genei mutante recesive (*a*) este $q = (1/2500)^{1/2} = 1/50 = 0{,}02$. Frecvenţa alelei normale (*N*) este $p = 1 - q = 1 - 1/50 = 49/50 = 0{,}98$. Frecvenţa heterozigoţilor (*2pq*) este egală cu 2 x 49/50 x 1/50 = 1/25, deci 4% din populaţie. Acest lucru are o importanţă deosebită pentru sfatul genetic acordat persoanelor din familia unui bolnav cu mucoviscidoză. Pentru afecţiunile autosomale recesive rare ($q^2 < 1/10000$) frecvenţa genei normale este $p = 1$ iar frecvenţa heterozigoţilor este aproximativ egală cu *2q*, deci de două ori frecvenţa genei mutante. De exemplu, în cazul fenilcetonuriei frecvenţa bolnavilor este de 1/10000 iar frecvenţa heterozigoţilor = $2\ (1/10000)^{1/2} = 2 \times 1/100 = 1/50$ sau 2% . Din ambele exemple prezentate mai sus se poate remarca faptul că *deşi bolnavii homozioţi sunt rari, heterozigoţii sunt numeroşi.* Deoarece numărul bolilor recesive este mare (circa 1500) foarte probabil că toţi oamenii poartă, în stare heterozigotă, câteva gene anormale; totuşi, probabilitatea ca aceste gene recesive să ajungă împreună la homozigoţi este redusă.

c. Boli legate de X

Aprecierea frecvenţei alelice pentru genele situate pe cromosomul X diferă de modul determinării frecvenţelor alelice pentru gene autosomale deoarece în cazul bolilor legate de X bărbaţii (XY) sunt hemizigoţi.

Pentru bolile recesive, bărbaţii pot avea numai două genotipuri posibile - X^NY *şi* X^aY - spre deosebire de femei (XX) care pot avea trei genotipuri X^NX^N, X^NX^a *şi* X^aX^a. *Frecvenţa (q) a genei mutante recesive (a) situată pe X este egală cu frecvenţa bolii la bărbaţi*; frecvenţa (*p*) a genei normale (N) este mult mai mare decât q, iar pentru afecţiunile foarte rare (q = foarte mic) p va fi aproape egal cu 1. Incidenţa celor două alele *N* şi *a* este aceeaşi la ambele sexe. De aici rezultă că *frecvenţa afecţiunilor recesive legate de X este mai mare la bărbaţi (q)* decât la femei (q^2) iar frecvenţa femeilor heterozigote (X^NX^a) va fi *2pq*, dublul frecvenţei bărbaţilor afectaţi (*2q*), deci mult mai mare ca a femeilor afectate, homozigote (q^2). De exemplu, în cazul cecităţii pentru culorile roşu-verde (produsă de mutaţii ale genelor pentru pigmentul vizual situate pe cromosomul X) frecvenţa bărbaţilor afectaţi este 8% deci frecvenţa genei mutante $q = 0{,}08$ iar a genei normale $p = 0{,}92$. Incidenţa femeilor afectate (q^2) este foarte mică $(0{,}08)^2 = 0{,}0064$, deci sub 1% dar frecvenţa femeilor heterozigote (X^NX^a) = $2\ pq = 2(0{,}92)(0{,}08) = 0{,}147$, în jur de 15%

În cazul afecţiunior dominante legate de X (de exemplu, rahitismul rezistent la vitamina D sau hipofosfatemic) situaţia este inversă; frecvenţa bolii va fi de două ori mai mare la femei decât la bărbaţi.

3.2 . EVALUAREA RENTABILITĂŢII UNOR PROGRAME DE DEPISTAJ GENIC

Introducerea unor programe de depistare a unor boli genetice la nou-născuţi este dependentă, printre altele, de frecvenţa bolii în populaţie. De exemplu, frecvenţa (q^2) a bolii Tay-Sachs la evreii Ashkenazi este de circa 1/3600; deci frecvenţa genei mutante (*q*) este 1/60 iar a

heterozigoţilor (*2pq*) de circa 1/30. Frecvenţa cuplurilor heterozigote (*Aa x Aa*) care au riscul naşterii unui copil afectat, este *2pq x 2pq* deci aproximativ 1/900. Dacă se presupune că fiecare astfel de cuplu va avea copii, depistarea bolii ar interea 1800 cupluri pentru a evita naşterea unui copil afectat. În populaţia generală non-Ashkenazi frecvenţa bolii Tay-Sachs este de 1/360000, deci q = 1/600, iar frecvenţa (*2pq*) heterozigoţilor 1/300. în aceste condiţii depistarea ar trebui să intereseze 180000 de cupluri pentru a descoperi un copil bolnav. Rezultă, evident, că limitarea depistarea la populaţia de evrei Ashkenazi este mult mai rentabilă decât în populaţia generală.

B. FACTORI CARE INFLUENŢEAZĂ FRECVENŢA GENICĂ ŞI GENOTIPICĂ

Echilibrul genic postulat de legea Hardy-Weinberg se realizează în anumite condiţii speciale. Legea nu este valabilă decât în populaţiile mari, panmictice (în care încrucişările sunt aleatorii), în care nu există mutaţii sau migraţii iar selecţia nu acţionează pentru sau împotriva unui anumit genotip. Aceste criterii sunt îndeplinite pentru caracterele umane normale (grupe sanguine, serice, enzimatice, tisulare) determinate de gene ”neutre”. Totuşi, în bolile genetice condiţiile precizate nu sunt totdeauna realizate şi o serie de factori, la care ne vom referi imediat, pot modifica frecvenţele genice şi genotipice în anumite populaţii umane. Dar amploarea factorilor ce intervin este *limitată*, modificările frecvenţei genelor sunt *echilibrate* fie la nivelul iniţial, fie la un nou nivel. Astfel legea Hardy-Weinberg rămâne relativ *valabilă* şi poate fi aplicată în practica geneticii medicale, pentru a estima frecvenţele alelice.

1. UNIUNILE (ÎNCRUCIŞĂRILE) NEÎNTÂMPLĂTOARE

a. Stratificare populaţiei şi încrucişările asortative

În majoritatea populaţiilor umane, uniunile (căsătoriile) sunt rareori aleatorii. Ele sunt de obicei orientate, în sensul că membrii unei subpopulaţii - definită pe criterii rasiale, etnice, religioase sau altele - se unesc mai frecvent cu alţi membri ai aceleiaşi populaţii. Acest lucru este firesc deoarece multe populaţii sunt *stratificate* fiind alcătuite din mai multe subgrupe cu un "profil genic" caracteristic. Uneori ele formează adevărate "*izolate*", populaţii mici în care membrii lor nu se vor uni (încrucişa) înafara grupului.

La acest fenomen de stratificare a populaţiei se adaugă *încrucişarea asortativă* sau preferenţială, care constă în alegerea partenerului pe baza anumitor criterii. Ea este de obicei "*pozitivă*", adică oamenii tind să-şi aleagă un partener care să le semene (de exemplu prin culoarea pielii, limbaj, statură, inteligenţă, aptitudini, etc.). Uneori există tendinţa alegerii partenerilor cu *probleme medicale asemănătoare*, de exemplu surditate congenitală, cecitate, nanism. În toate situaţiile în care selecţia partenerului este preferenţială şi deci restrictivă la membrii aceluiaşi subgrup, iar atributele comune se află sub control genetic, se produce la descendenţi *o creştere a frecvenţei genotipurilor homozigote* pentru anumite gene şi o reducere corespunzătoare a frecvenţei heterozigoţilor.

b. Încrucişările consanguine

Un aspect particular al uniunilor nonaleatorii îl reprezintă *încrucişările consanguine*. Frecvenţa lor a scăzut în ultimele decenii, fiind mai dese în anumite subgrupe populaţionale. Doi indivizi sunt consideraţi consanguini dacă au cel puţin un strămoş comun până la a treia generaţie de ascendenţi (stră-străbunic). Ei vor avea mai multe gene în comun decât indivizii neînrudiţi. Ca şi în situaţiile enunţate mai sus se produce *o creştere a posibilităţilor de întâlnire a doi heterozigoţi* pentru aceeaşi genă şi deci o amplificare la descendenţi a proporţiei homozigoţilor bolnavi cu afecţiuni recesive severe, boli poligenice/multifactoriale sau malformaţii congenitale. *Riscul naşterii unui copil homozigot pentru o alelă recesivă rară este proporţional cu gradul de înrudire* (vezi capitolul 5.D.2.3). Pentru verii primari riscul unui urmaş anormal fizic sau mintal

este aproape dublu faţă de riscul unui cuplu neînrudit din populaţia generală (1/30 faţă de 1/50); la verii de gradul II riscul se reduce iar la celelalte grade de înrudire, mai îndepărtate, el este practic neglijabil (exceptând situaţiile în care în fiecare din familiile înrudite există un bolnav cu o afecţiune identică).

2. MUTAŢIILE

Mutaţiile determină o modificare sau o pierdere a funcţiei unei gene, ducând la apariţia unor caracteristici noi – utile, neutre sau defavorabile. Mutaţiile favorabile au jucat un rol important în lunga evoluţie biologică a omului, care a atins un maxim greu de depăsit. Marea majoritate a mutaţiilor noi sunt în prezent *defavorabile* şi tind să rupă echilibrul genic din populaţie.

Amploarea efectului defavorabil al unei mutaţii se poate aprecia prin consecinţele sale asupra *" capacitatii biologice de supravieţuire şi reproducere "* (în limba engleză *fitness*) sau *"indicelui de fertilitate"* al individului. El reprezinta principalul (după alţii, unicul) factor care determină dacă o genă mutantă este "pierdută" imediat, supravieţuieşte câteva generaţii sau devine o alelă predominantă. O mutaţie poate fi *letală* atunci când nu se transmite la generaţia următoare deoarece afectează supravieţuirea sau reproducerea (produce moarte sau sterilitate). Exemple: osteogenesis imperfecta tipul 2 (boala oaselor de "sticlă"), sindromul Apert (acrocefalosindactilie), displazia tanatoforică etc. Mutaţiile *subletale* reduc rata de reproducere; de exemplu, în acondroplazie (o formă de nanism cu membre scurte) indicele de fertilitate este 0,20.

Mutaţiile se produc continuu, în toate genele, şi efectele lor defavorabile realizează în ansamblu *"povara genetică"* sau reducerea cumulată a capacităţii reproductive de către toate mutaţiile produse la toţi indivizii unei populaţii. Mutaţiile dominante sau recesive legate de X se exprimă la heterozigoţi şi, respectiv, hemizigoţi. In schimb, mutaţiile recesive, destul de frecvente, nu se manifestă la heterozigoţi. In acest caz, povara genetică se poate măsura prin creşterea ratei deceselor printre urmaşii căsătoriilor consanguine (care, aşa cum am precizat, favorizează întâlnirea a doi heterozigoţi pentru aceeaşi genă şi creşterea proporţiei descendenţilor homozigoţi). S-a calculat că fiecare persoană normală poartă (posedă) în stare heterozigotă trei până la cinci gene recesive, letale la homozigoţi; ele diferă însă ca tip de la o persoană la alta.

Efectul negativ al mutaţiilor asupra echilibrului genic din populaţie este totuşi redus pentru cel puţin două motive majore:

- Majoritatea genelor umane au *o rată de mutaţie relativ mică,* de ordinul 10^{-6} la 10^{-5} per locus/gamet/generaţie;

  Excepţie fac două boli genetice cu rată mare de mutaţie, de ordinul 10^{-4}. Acestea sunt neurofibromatoza tip 1 (NF1) şi miopatia Duchenne (DMD); în primul caz nu se cunoaşte explicaţia exactă a fenomenului dar în DMD rata înaltă a mutaţiilor se explică prin talia foarte mare a genei (>2000Kb) care o face mai vulnerabilă la acţiunea agenţilor mutageni.
- Efectul mutaţiilor este influenţat şi în mare măsură *contrabalansat de selecţie*, păstrându-se astfel un echilibru genic. Menţinerea unei frecvenţe genice constante se realizează prin înlocuirea genelor anormale, pierdute prin deces sau sterilitate într-o generaţie, prin mutaţii noi în generaţia următoare. Cu cât indicele de fertilitate este mai mic cu atât proporţia pacienţilor la care boala se produce prin neomutaţii este mai mare; aşa se întâmplă în distrofia musculară Duchenne sau în acondroplazie; în schimb, în coreea Huntington, la care debutul simptomatologiei clinice este tardiv şi fertilitatea cvasinormală, neomutaţiile joacă un rol minor în ansamblul cazurilor cu această boală.

3. SELECŢIA

Selecţia este unul din factorii importanţi care intervin în modificarea frecvenţei genelor în

populaţie. Ea poate fi *naturală*, independentă de acţiunea omului, sau *artificială*, consecinţa intervenţiei sale active.

Selecţia naturală reprezintă acţiunea factorilor de mediu asupra fenotipurilor determinate de mutaţii noi, pe care le sortează, favorizând fenotipurile utile (cu capacitate de adaptare ridicată) pentru individ, populaţie şi specie. Genotipurile dezavantajoase sunt *selectate negativ* (eliminate) şi contribuie cu foarte puţine gene la fondul generaţiei următoare: genotipurile avantajoase sunt *selectate pozitiv* (menţinute) şi contribuie cu un număr mare de gene la generaţia următoare. Astfel, selecţia stabileşte *cota relativă de gene* prin care indivizii cu genotipuri diferite contribuie la fondul comun de gene al populaţiei în funcţie de viabilitatea şi fertilitatea lor. Prin aceasta, selecţia este un factor important în modificarea frecvenţei genelor în populaţie.

Selecţia naturală nu trebuie înţeleasă ca "o luptă pentru existenţă" sau "o supravieţuire a celor mai apţi" – aşa cum era interpretată de către darwinişti. Selecţia naturală este o problemă de "reproducere diferenţiată" (supravieţuirea celor mai apţi pentru a lăsa urmaşi). Genotipurile noi realizate prin mutaţii nu au aceeaşi viabilitate şi fecunditate.*"Aptitudinea biologică de supravieţuire şi reproducere a indivizilor"* (în engleză - *fitness*) este diferită pentru fiecare genotip; selecţia favorizează indivizii cu cea mai ridicată capacitate de reproducere şi elimină variaţiile care slăbesc/anulează potenţialul reproductiv. *Selecţia naturală acţionează deci prin diminuarea sau creşterea aptitudinii biologice reproductive (fitness) a indivizilor cu mutaţii.*

> **Indicele de fertilitate** (f) măsoară aptitudinea reproductivă a unui individ şi deci contribuţia sa la fondul genetic al generaţiei următoare; valoarea lui "f" poate oscila între zero (alelă genetic letală, în sensul că anulează fertilitatea, chiar dacă modificarea fenotipică nu este letală) şi 1 (indicele de fertilitate al alelei normale). Trebuie să subliniem că indicele de fertilitate este parametrul cel mai util în compararea diferitelor genotipuri într-o populaţie dar el este valabil în contextul unui mediu particular în care există o diferenţă de "fitness".

Există, schematic, patru moduri de acţiune a selecţiei naturale:

- contra mutaţiilor dominante autosomale,
- contra homozigoţilor (sau hemizigotilor) recesivi,
- contra heterozigoţilor,
- în favoarea heterozigoţilor.

Primele trei tipuri duc la o incapacitate în transmiterea genei, prin reducerea duratei de supravieţuire şi/sau infertilitate. Indicele de fertilitate scade, uneori până la zero. Al patrulea tip de acţiune a selecţiei naturale favorizează heterozigoţii comparativ cu ambele tipuri de homozigoţi. Frecvenţele actuale ale alelelor mutante sunt rezultatul echilibrului între "pierdere" prin selecţie şi "câştig" prin mutaţii noi ± avantajul selectiv al heterozigoţilor

(1). Selecţia contra mutaţiilor dominante autosomale.

O genă dominantă defavorabilă este supusă direct selecţiei, deoarece ea se manifestă fenotipic la heterozigoţi ca şi la homozigoţi. Selecţia acţionează rapid şi transmiterea mutaţiei la generaţiile următoare depinde de aptitudinile de supravieţuire şi reproducere ale indivizilor ce au mutaţia. Unele boli autosomal dominante (de exemplu, osteogenesis imperfecta tipul 2; acrocefalosindactilia Apert; diaplazia tanatoforică) sunt *letale* au "un fitness" zero, şi se produc numai prin mutaţii noi. Alte boli dominante sunt *subletale* şi au o rată de reproducere redusă; de ex, în acondroplazie indicele de fertilitate este 0.20 deci numai 20% din genele pentru acondroplazie trec de la o generaţie la alta. Restul de 80% gene mutante, necesare menţinerii constante a frecvenţei acondroplaziei în populaţie, provin prin mutaţii noi.

(2). Selecţia contra mutaţiilor recesive defavorabile.

În acest caz selecţia este mai puţin eficientă şi foarte lentă deoarece numai o mică proporţie a acestor gene sunt prezente şi manifestă la homozigoţi; marea lor majoritate sunt "ascunse" la heterozigoţi, care au un indice de fertilitate normal. În cazul mutaţiilor recesive ale genelor situate pe cromosomul X selecţia se face contra bărbaţilor hemizigoţi. În unele boli letale, de exemplu, distrofia musculară Duchenne, bărbaţii bolnavi nu se reproduc şi numai genele prezente la femeile purtătoare sunt transmise generaţiei următoare. Astfel 1/3 din toate genele

mutante sunt pierdute în fiecare generaţie şi, pentru a se păstra frecvenţa constantă a bolii ele vor fi înlocuite prin mutaţii noi. În alte boli mai puţin severe, de exemplu hemofilia, o parte dintre bărbaţii afectaţi se pot reproduce şi proporţia cazurilor de hemofilie care rezultă prin mutaţii noi este de obicei 15% .

(3) Seleţia contra heterozigoţilor. În cazul sistemului de grup sanguin Rh la femeile Rh negative (*dd*) se realizează o selecţie contra feţilor Rh pozitivi, heterozigoţi (*Dd*) care dezvoltă boala hemolitică a noului născut. Dar, incompatibilitatea materno-fetală poate fi în prezent prevenită prin administrarea globulinei imune anti-Rh; în felul acesta selecţia contra heterozigoţilor nu va mai avea loc şi, în timp, va creşte incidenţa alelei recesive Rh-negative.

(4) Selecţia în favoarea heterozigoţilor. În anumite condiţii de mediu heterozigoţii pentru anumite boli au un avantaj selectiv faţă de ambele tipuri de genotipuri homozigote. Aceasta va determina o creştere a frecvenţei unei gene, care reduce sever supravieţuirea şi reproducerea la homozigoţii recesivi (*aa*). Exemplul clasic de avantaj selectiv este rezistenţa la malarie a heterozigoţilor pentru sicklemie (dreponocitoză). În regiunile în care malaria este endemică (de exemplu Africa de Vest) homozigoţii normali sunt vulnerabili la infestare şi vor avea o fertilitate mai redusă comparativ cu heterozigoţii, în eritrocitele cărora nu se pot dezvolta protozoarele parazite din genul Plasmodium (introduse în organism prin înţepăturile ţânţarilor Anopheles). În consecinţă, frecvenţa genei mutante pentru HbS creşte în timp, în aceste regiuni. Protecţia heterozigoţilor contra malariei reprezintă o explicaţie plauzbilă şi pentru frecvenţele crescute ale altor gene mutante în anumite regiuni: hemoblobina C, talasemie, deficienţă în G6PD. Frecvenţa crescută a mucoviscidozei în populaţia europeană poate fi datorată unui avantaj selectiv al heterozigoţilor (incomplet elucidat). Situaţia în care selecţia operează în două direcţii diferite – eliminând genele nocive prin efectul negativ asupra homozigoţilor (*aa*) dar avantajând heterozigoţii (*Na*) – se numeşte *polimorfism echilibrat* deoarece menţine constant raportul dintre genele alele de-a lungul generaţiilor.

Numeroase mutaţii în regiunile codante ale unor gene sau modificări în secvenţa nucleotidică a ADN din regiunile necodante sunt "neutre" din punct de vedere al efectului lor fenotipic. Asupra lor nu acţionează – favorabil sau defavorabil – selecţia. Și totuși ele s-au fixat în populaţie, în absenţa selecţiei, prin procese genetice “întâmplătoare”. Kimura (1978) a formulat “teoria neutrală a selecţiei”, în esenţa ei nedarwiniană; ea nu contestă importanţa selecţiei dar consideră că aceasta nu reprezintă singurul element care hotărăşte soarta mutaţiilor.

4. POPULAŢIILE REDUSE

a. Deriva genetică întâmplătoare

Pentru motive diferite (geografice, religioase, politice) un subgrup restrâns dintr-o populaţie se poate izola fizic şi/sau social de restul populaţiei formând un izolat genetic. În populaţiile mici se poate produce un fenomen care modifică echilibrul Hardy-Weinberg: el este numit **deriva genetică** întâmplătoare. Spre deosebire de populaţiile mari, în care *variaţii în numărul copiilor* produşi de indivizi cu genotipuri diferite nu influenţează semnificativ frecvenţa genelor, în poplaţiile mici asemenea variaţii pot modifica, uneori considerabil, această frecvenţă. Dacă într-o astfel de populaţie, gena "*A*" este mai frecventă ca alela ei "*a*" şi, din întâmplare, indiizii cu gena *"a"* nu au copii sau nu o transmit la descendenţi, atunci, după câteva generaţii, gena *"a"* va dispărea iar gena *"A"* se va fixa mai puternic, deci se va produce o modificare considerabilă în frecvenţa genică. Astfel s-ar putea explica frecvenţa crescută a unor grupe sanguine şi boli genetice în anumite populaţii mici, dar deseori este greu de acceptat că deriva genetică este unica cauză a fenomenului.

b. Efectul de fondator

O altă explicaţie a incidenţei mari a unor afecţiuni genetice în anumite populaţii este *"efectul de fondator"*. Dacă membrii fondatori ai unui subgrup poartă, din întâmplare, o genă mutantă recesivă rară, prin încrucişările ulterioare în cadrul subgrupei populaţionale respective se produce o homozigotare frecventă şi o creştere a frecvenţei homozigoţilor şi deci a incidenţei

bolii produsă de gena mutantă. Se cunosc mai multe exemple: frecvenţa crescută a bolii Huntington în regiunea Lacului Maracaibo din Venezuela, a tirozinemiei în Canada franceză sau a porfiriei variegata în Africa de Sud.

Ultimul exemplu este foarte sugestiv pentru efectul de fondator. Populaţia albă afrikaner din Africa de Sud a rezultat dintr-un grup mic de imigranţi, în special din Olanda, venit în secolul XVII; creşterea numerică a fost explozivă generând circa un milion de indivizi din populaţia actuală. Unul din membrii fondatori a prezentat porfiria variegata, o boală autosomal dominantă caracterizată prin fotosensibilitate şi fenomene neuroviscerale. Prin încrucişare preferenţială frecvenţa bolnavilor este astăzi de 3/1000, foarte mare comparativ cu cea din Olanda sau alte ţări ale lumii.

O acţiune combinată a derivei genetice şi efectului de fondator s-a înregistrat în Finlanda, unde populaţia a fost mult timp izolată genetic, geografic, lingvistic şi cultural. La acest fenomen iniţial s-a adăugat în ultimile secole o expansiune populaţională (de la circa 400000 la aproape 5 milioane). Acestea par să fie explicaţiile posibile ale frecvenţei crescute în Finlanda a circa 20 de boli genetice, rare în alte zone ale lumii (sindromul nefrotic congenital, aspartil-glicozaminuria, coroideremia etc.).

În finalul acestei prezentări vom sublinia că specificitatea etnică a unor mutaţii are implicaţii deosebite în aplicarea tehnicilor ADN de diagnostic molecular al bolilor ereditare în anumite populaţii, precum şi faptul că mobilitatea relativă a populaţiilor actuale va reduce considerabil deriva genetică în viitor.

5. MIGRAŢIILE ŞI FLUXUL GENIC

Migraţiile unui grup etnic/populaţie dintr-o zonă geografică în alta şi încrucişările/ căsătoriile mixte cu populaţia indigenă (cu o structură genetică diferită) pot modifica frecvenţele alelice în cele două populaţii. Se produce fenomenul de **flux genic** definit ca o difuziune lentă a genelor dincolo de barierele rasiale. Procesul implică populaţii mari şi o modificare gradată în frecvenţele genice (deosebindu-se net de deriva genetică care produce variaţii întâmplătoare în populaţii mici). În urma imigrării, constelaţia genică a populaţiei gazdă se îmbogăţeşte.

O dovadă convingătoare a fluxului genic este scăderea gradată a frecvenţei grupului sanguin B de la 25-30% în Estul Asiei la 6-8% în populaţiile Europei de Vest; ea se datorează în mare măsură migraţiilor istorice de la Est spre Vest ale grupurilor asiatice (în care a apărut prin mutaţie alela B a locusului ABO) şi amestecului lor cu populaţiile europene (care iniţial nu aveau probabil această genă). Un alt exemplu: s-a observat că frecvenţa unei alele mutante specifice ce produce fenilcetonuria este mare în populaţia de origine celtică (1/4500 în Irlanda) şi scade în alte populaţii din nordul şi sudul Europei, reflectând migraţia geografică a celţilor.

Gena *CCR5* codifică un receptor al citokinelor care serveşte ca punct de intrare în celule a virusului imunodeficienţei umane (HIV) ce produce SIDA. Printr-o deleţie de 32 pb în această genă se produce o alelă (*CCR5del*) care codifică o proteină nefuncţională; indivizii homozigoţi pentru alela *CCR5del* nu exprimă receptorul pe suprafaţa celulelor şi, în consecinţă, sunt rezistenţi la infecţia cu HIV. Frecvenţa alelei *CCR5del* scade de la aproximativ 10% în Nord-Vestul Europei la câteva procente în Asia şi India, fiind virtual absentă în Africa; aceasta sugerează că mutaţia a apărut în populaţia din Nord-Vestul Europei şi a difuzat spre Sud-Est. Epidemia de SIDA este prea recentă pentru a afecta frecvenţa genică; probabil au intervenit alte fenomene: deriva genetică, fluxul genic sau acţiunea altui factor selectiv (poate o altă boală infecţioasă, cum ar fi ciuma bubonică)

În general, se apreciază că 70-80% din totalul genelor noi dintr-o populaţie sunt gene "imigrate". De aceea, migraţia este considerată o sursă importantă de variaţii ereditare.

6. EFECTELE ACŢIUNILOR DISGENICE ŞI EUGENICE ASUPRA FRECVENŢELOR GENICE

a. Eufenia

Eficienţa selecţiei naturale poate fi influenţată prin intervenţia activă igienico-medicală a omului ("selecţie artificială"). Ansamblul acţiunilor medicale asupra fenotipului care urmăresc reducerea efectelor expresiei unor gene mutante defavorabile este numit *eufenie*. Astfel se poate realiza o modificare a frecvenţei genelor prin:

- scăderea vârstei reproductive a părinţilor, care ar putea reduce numărul subiecţilor cu anomalii cromosomice născuţi din femei de peste 35-40 de ani sau al copiilor cu boli prin mutaţii genice când tatăl a depăşit vârsta de 40 de ani;
- diminuarea legăturilor consanguine, în special când în familie există bolnavi cu afecţiuni recesive;
- limitarea acceptată a reproducerii la persoanele cu risc genetic crescut sau folosirea diagnosticului prenatal şi a avortului selectiv; aceste acţiuni reduc posibilitatea transmiterii în generaţia următoare a bolilor autosomale dominante şi recesive legate de X; în contrast, restricţia reproducerii nu va avea efecte asupra incidenţei bolilor autosomale recesive;
- tratamentul medical al bolnavilor cu boli genetice (de exemplu, fenilcetonuria, hipotiroidia) sau multifactoriale (de exemplu diabet zaharat, diferite malformaţii congenitale izolate, etc) cu "fitness" nul sau scăzut.

Primele trei categorii de măsuri determină o diminuare a frecvenţei genelor anormale; în schimb, tratamentul medical al bolnavilor cu genopatii, care altădată erau excluşi natural de la reproducere sau aveau o reproducere dificilă şi limitată, creşte "aptitudinile lor reproductive" şi determină, în timp, o creştere a frecvenţei genelor morbide implicate, care altădată erau eliminate. Acest efect de relaxare a selecţiei este valabil pentru bolile autosomale dominante şi legate de X. S-a calculat însă că efectul disgenic al măsurilor genetice şi medicale actuale este relativ scăzut.

b. Eugenia.

În contextul selecţiei "artificiale" este important să discutăm şi problema eugeniei. Termenul, introdus de Francis Galton (1883) semnifică îmbunătăţirea populaţiilor umane prin încrucişări selective, preferenţiale. Eugenia este de fapt controlul opţiunilor reproductive ale individului în beneficiul societăţii / pentru a realiza un scop social. Se poate deosebi o *eugenie negativă* care limitează/interzice reproducerea unor persoane cu caractere defavorabile (de exemplu, indivizi cu handicap fizic, senzorial, psihic) şi *eugenia pozitivă* care urmăreşte propagarea unor caractere remarcabile prin încrucişare selectivă (de exemplu, inteligenţa, în cadrul proiectului aberant de inseminare artificială cu gameţii... laureaţilor Premiilor Nobel sau, mai recent, *clonarea reproductivă*).

Politica eugenică a devenit populară şi a fost implementată în America de Nord şi Europa, în primele decenii ale secolului 20, datorită largii acceptări a rasismului şi darwinismului social în concepţiile păturii conducătoare ale timpului. Eugenia a fost folosită ca suport "ştiinţific" pentru: politica restrictivă de emigrare, legile prohibitive ale căsătoriilor pe baza rasei şi uneori a handicapului, legile de sterilizare ale unor persoane cu defecte genetice severe sau pentru exterminarea evreilor şi altor minorităţi etnice de către naziști. Aceste acţiuni discriminatorii au creat ulterior o benefică "reacţie adversă" faţă de eugenie.

Ideile eugenice negative sau pozitive, ferite de exagerări socio-politice, sunt seducătoare. Se pune firesc întrebarea: sunt justificate ştiinţific, pot fi acceptate etic? Cunoştiinţele actuale din genetica medicală nu aduc un suport ştiinţific cât de cât consistent programelor eugenice.

- În cazul *eugeniei negative* ne vom referi doar la afecţiunile recesive. Frecvenţa mare a heterozigoţilor arată inconsistenţa măsurilor preconizate de cei care îşi propun să "amelioreze" specia umană împiedecând de la procreare bolnavii cu afecţiuni genetice recesive. Aceste măsuri ar suprima un număr foarte mic de gene în raport cu cele transmise de heterozigoţi.
- În cazul *eugeniei pozitive* există rezerve ştiinţifice serioase: este greu de stabilit ce caractere ereditare sunt benefice; genele "pozitive" ale unor oameni dotaţi se manifestă într-o anumită configuraţie genică particulară, deseori unică şi deci greu de reprodus la descendenţi; formarea gameţilor presupune un amplu proces întâmplător de recombinare a genelor parentale; încrucişarea selectivă reduce diversitatea şi limitează astfel capacităţile de adaptare la modificările mediului.

La aceste date genetice, ce contravin eugeniei se adaugă şi conceptele bioeticii, căci în fond orice program eugenic reprezintă *pierderea libertăţii personale* prin subjugarea intereselor idividului pentru interesele unei societăţi viitoare. Aşa cum vom vedea în capitolul 20, dilemele etice ale geneticii sunt mai numeroase dar în rezolvarea lor *primează de obicei libertatea de opţiune a individului*. Şi totuşi există câteva probleme "fierbinţi" iar în contextul discuţiei eugeniei trabuie să remarcăm faptul că diagnosticul prenatal, care prin perfecţionarea şi simplificarea tehnicilor se extinde treptat la un număr tot mai mare de femei gravide, este în fond o modalitate de selecţie a embrionilor şi de "eradicare" a unor boli prin eliminarea pur şi simplu a fetuşilor afectaţi. Suntem confruntaţi cu o nouă dilemă: *"to kill or not to kill - that is a question"*. Or, misiunea medicilor este de a îngriji înainte de a fi judecători.

C. ORIGINEA ŞI EVOLUŢIA POPULAŢIILOR UMANE

Originea şi evoluţia speciei umane este unul dintre subiectele cele mai larg dezbătute în decursul timpului de către diferite categorii de specialişti care, într-un efort comun, au încearcat să înţeleagă şi să reconstituie pas cu pas procesul complex al devenirii speciei umane. În această acţiune, tehnologiile geneticii moleculare au deschis recent noi posibilităţi de abordare a procesului de evoluţie a omului modern. Antropologia moleculară. a furnizat deja numeroase informaţii despre evoluţia omului, legăturile sale cu celelalte specii de primate, asemănările dintre oamenii străvechi şi cei actuali, migraţiile populaţiilor ancestrale sau relaţiile dintre populaţiile umane actuale. Datele obţinute sunt foarte preţioase dar, totuşi, insuficiente pentru a rezolva fără echivoc multiplele şi complexele probleme ale originii şi evoluţiei speciei umane.

Înainte de a prezenta „scenariul" devenirii omului modern, *Homo sapiens sapiens*, vom preciza că trăsăturile sale morfo-funcţionale l-au plasat în clasificările zoologice în ordinul primate, subordinul Antropoide, familia Hominide – fiind înrudit printr-un strămoş comun cu maimuţele antropoide africane, din familia Pongide, şi mai ales cu cimpanzeul („vărul nostru din...Africa").

1. DOVEZILE PALEOANTROPLOGIEI.

În opinia paleoantropologilor, evoluţia omului a fost marcată de patru evenimente cheie: trecerea la viaţa terestră, locomoţia bipedă, encefalizarea şi civilizaţia (cultura). Fiecare dintre aceste evenimente a determinat o serie de noi adaptări morfo-funcţionale şi comportamentale care au orientat evoluţia spre omul modern.

Reconstituirea procesului de evoluţie a omului s-a făcut pe baza *studiului fosilelor* scoase la lumină din rocile epocilor geologice. Datarea fosilelor, analiza comparativă a caracterelor anatomice şi distribuţia lor geografică au permis paleoantropologilor alcătuirea unei schiţe a evoluţiei omului (figura 7.1), care este – în mod firesc – şi incompletă şi provizorie.

Strămoşul comun din care au descins maimuţele antropoide şi hominidele a trăit în Africa în urmă cu circa 8 milioane de ani. Separarea celor două linii evolutive s-a produs acum 6 milioane de ani. Primele forme considerate a se fi înscris pe linia umanizării (deci cele mai vechi) aparţin genului *Australopitecus* şi cuprind un grup de specii care au trăit în Africa, acum 4 milioane de ani.

Australopitecii se caracterizau printr-o capacitate craniană de 400–500 cc, comparabilă cu cea a cimpanzeului, dar spre deosebire de acesta aveau mers biped. Cel mai mediatizat australopitec este A.afarensis, reprezentat de „Lucy", o fosilă descoperită în 1974 la Afar, în Etiopia şi datată cu o vechime de 3,2 milioane de ani[2].

[2] Cea mai veche fosilă bipedă descoperită recent (1995), în Keya, are o vechime de 4 milioane de ani.

O ramură a australopitecilor, a evoluat acum 2 milioane de ani spre reprezentanţii *genului Homo* - strămoşii noştri direcţi. Urmează o succesiune de specii – *H. habilis, H. erectus, H. sapiens* – caracterizate prin creşterea progresivă a creierului, graiul articulat, folosirea mai amplă a mâinilor pentru construirea de unelte din piatră, folosirea focului, organizarea socială.

- Primul reprezentant al genului Homo este considerat *Homo habilis* (omul îndemânatic), primul producător de unelte; era gracil, biped, similar australopitecilor în multe privinţe, dar cu o capacitate craniană mai mare între 500 şi 800 cc[3] şi cu o faţă mai puţin prognată.
- *Homo erectus* reuneşte sub această denumire numeroase fosile care au trăit acum 1,8 milioane – 300.000 de ani în urmă şi care au fost descoperite în diferite zone geografice (Java, China şi Africa). H.erectus avea o talie similară omului modern, mers biped, schelet robust, capacitate craniană între 780 – 1225 cc iar morfologia mâinii era asemănătoare cu cea a omului modern; folosea graiul articulat, trăia în colectivităţi organizate social, producea şi utiliza unelte de piatră, folosea focul. H.erectus ocupa teritorii ale Africii tropicale şi prin migraţii s-a extins în Eurasia
- *H.sapiens arhaic* (omul inteligent arhaic) a apărut cu 500.000 de ani în urmă. Prezenta caractere asemănătoare cu H.erectus dar scheletul era mai puţin robust, craniul mai rotunjit, capacitatea craniană de circa 1300 cc, mărimea dinţilor diminuată. O ramură de evoluţie închisă a lui H.sapiens a fost H.sapiens neanderthalensis care a trăit între 230.000 şi 30.000 de ani în urmă. Avea o constituţie robustă, capacitate craniană de circa 1450 cc, aparat vocal similar morfologic cu al omului modern. Trăia în colectivităţi, se adăpostea în peşteri, producea unelte mai sofisticate, folosea focul şi îşi confecţiona îmbrăcăminte din pieile animalelor pe care le vâna.

Homo sapiens sapiens (omul modern) a apărut în urmă cu 120.000 de ani. Fosilele descoperite evidenţiază trăsături anatomice similare omului actual.

Talia lor era între 160 şi 180 cm, scheletul gracil, capacitatea craniană în medie 1.600 cc (encefal mărit, neocortex şi ganglioni bazali dezvoltaţi), fruntea înaltă, arcadele sprâncenare slab dezvoltate, pilozitatea redusă. Totuşi, faţa era uşor prognată, bărbia proeminentă, dinţii relativ mari. Reprezentanţii lui H.sapiens sapiens erau larg răspândiţi, pe teritorii cu condiţii de viaţă diverse.

Deşi prezentau trăsăturile anatomice ale omului modern, primii reprezentanţi ai lui H.sapiens sapiens nu aveau comportamentul acestuia. Reconstituirea modului lor de viaţă arată că au devenit moderni comportamental mai târziu, acum aproximativ 50.000 de ani, când probabil a avut loc o „mutaţie" al cărui efect a fost mărirea plasticităţii creierului, dezvoltarea capacităţii de a prelucra informaţii, de a combina şi recombina activităţi diferite.

Au căpătat abilitatea de a produce unelte şi arme mult mai sofisticate folosind ca materie primă oase şi coarne de animale, construiau adăposturi permanente, îşi confecţionau îmbrăcămintea, gravau şi sculptau în scop decorativ, produceau obiecte de podoabă, aveau activităţi artistice, şi-au dezvoltat limbajul. Creşterea numerică a populaţiilor a determinat apariţia competiţiei şi a inovaţiei, a impus schimbări ale regimului alimentar bazat mai mult pe carne şi peşte, a influenţat migraţiile (cauzate şi de schimbările climaterice).

Printre formele „primitive" ale omului modern este inclus şi *omul de Cro-Magnon* considerat a fi primul reprezentant al lui H.sapiens sapiens în Europa (acum 40.000 de ani).

Una dintre problemele controversate ale apariţiei *omului modern* este originea sa geografică. Există două ipoteze (figura 7.2):

- Ipoteza multiregională consideră că H. Erectus a părăsit Africa acum 1,5 milioane de ani şi a evoluat către H.sapiens într-un timp îndelungat (circa un milion de ani) în zone geografice diferite precum Africa, Europa şi Asia, independent şi simultant, formând populaţii regionale distincte care prezintă diferenţieri morfologice locale. Această ipoteză are din ce în ce mai puţini adepţi.
- Ipoteza uniregională („Out of Africa") – sau a înlocuirii africane – arată că H.sapiens a apărut doar în Africa, mai târziu, în urmă cu circa 100.000 de ani, şi s-a răspândit în mai multe valuri migratorii spre Asia, Europa, Australia şi America înlocuind complet populaţiile de supravieţuitori ai lui H.erectus existente în acele zone (care nu au contribuit la formarea omului modern).

Vom preciza în încheiere că scenariul paleoantropologilor privind evoluţia omului (figura 7.1) reflectă o imagine incompletă a trecutului său preistoric. Sunt încă multe

[3] În 2001, în Georgia, a fost descoperit scheletul fosilei H.georgicus cu o vechime de 1,8 milioane de ani, cu trăsături intermediare între H.habilis şi H.erectus.

necunoscute: locul de origine a omului modern, momentul exact al migraţiilor populaţionale din Africa, încrucişarea migratorilor cu speciile locale sau înlocuirea completă a acestora.

2. DOVEZILE GENETICE ALE EVOLUŢIEI

Tehnologiile geneticii moleculare au permis extragerea ADN-ului din fragmentele osoase ale unor fosile, analiza secvenţei de nucleotide şi compararea cu secvenţele ADN ale speciilor actuale. Evaluarea diferenţelor dintre secvenţele ADN ale unor specii diferite indică gradul lor de înrudire genetică şi momentul scindării dintr-un strămoş comun; cu cât secvenţele ADN sunt mai asemănătoare, cu atât speciile respective s-au separat mai recent.. Astfel, geneticienii pot reconstitui trecutul preistoric al omului modern folosind modalităţile specifice ale antropologiei moleculare.

a. Studiul genetic al primatelor

Studiul genetic al primatelor are un obiectiv dublu: stabilirea gradului de înrudire genetică dintre specii şi construirea unui arbore filogenetic; descifrarea mecanismelor genetice implicate în evoluţie şi speciaţie.

Studiul citogenetic comparativ al cromosomilor la om (2n=46) şi la speciile actuale din familia Pongidae (cimpanzeul, gorila şi urangutanul) (2n=48) a oferit informaţii preţioase despre evoluţia cariotipului. Principala modificare, esenţială pentru evoluţia speciei umane, a fost o *fuziune telomerică* a doi cromosomi de la primate, prin care s-a format cromosomul 2 uman (absent la celelalte specii de antropomorfe) şi s-a redus numărul de cromosomi de la 48 la 46 (figura 7.3). Alte modificări sunt reprezentate de câteva inversii pericentrice şi paracentrice; în rest modelul de distribuţie a benzilor cromosomice este asemănător

Studiul secvenţelor nucleotidice la om şi maimuţele antropomorfe relevă că cel mai apropiat de om este cimpanzeul iar separarea celor două specii dintr-un strămoş comun s-a făcut acum 5,5 milioane de ani. Mărimea genomului şi numărul total de gene sunt aproape identice, există o conservare puternică a sinteniei (gene înlănţuite) iar secvenţele de ADN codant analizate au o identitate cuprinsă între 98% şi 100%. De asemenea, analiza diferitelor tipuri de ADN necodant relevă o similitudine a secvenţei de circa 98%. Există însă şi diferenţe genetice produse prin unele mici duplicaţii subgenomice (care au dus la duplicaţia unor gene şi exoni sau la duplicaţia unor secvenţe ADN non-codante) şi unele mutaţii genice.

W.Enard et. al. (2002) au identificat prima genă, denumită FOXP2 (Forkhead Box P2), cu un rol cheie în dezvoltarea limbajului articulat al omului. Oamenii cu mutaţii ale acestei gene au dificultăţi severe de vorbire. Compararea genei FOXP2 umane cu variantele ei de la cimpanzeu, gorilă, urangutan şi şoarece a relevat identitatea secvenţelor lor cu excepţia a două modificări cheie ale genei umane. Efectul acestor schimbări ar consta în abilitatea omului de a face mişcări fine ale gurii şi laringelui, şi astfel, să dezvolte limbajul articulat. Este prima dovadă genetică a faptului că vorbirea articulată este întâlnită doar la om. Varianta umană a acestei gene a apărut acum 200 000 de ani şi a permis predecesorilor omului modern să comunice informaţii de la o generaţie la alta. Autorii consideră că graiul articulat a jucat un rol important în migraţiile populaţionale.

În concluzie, mecanismele care au orientat evoluţia primatelor şi au realizat divergenţa între om şi cimpanzeu au fost unele modificări cromosomice şi/sau mutaţii ale genelor implicate în controlul gametogenezei şi al reglării stadiilor timpurii ale dezvoltării embrionare care au contribuit la iniţierea desprinderii din populaţia ancestrală comună. Populaţiile care s-au scindat, şi-au schimbat treptat constituţia genetică, diferenţele genetice dintre ele s-au extins, au apărut trăsături morfofuncţionale distincte, s-au izolat reproductiv şi au devenit specii noi.

b. Studiul genetic al fosilelor omului modern

În majoritatea cazurilor ADN-ul formelor fosile nu poate fi prelucrat: fie fosilele depăşesc vârsta limită (peste 100 000 de ani) pentru asemenea analize, fie s-au păstrat în condiţii improprii. Totuşi, în ciuda acestor limite, au fost posibile studii la fosile ce aparţineau omului de Neanderthal şi omului de Cro-Magnon.

- Studiul secvenţei ADNmt a unor neanderthalieni fosili şi compararea sa cu secvenţele ADNmt ale omului actual şi cimpanzeului a confirmat ipoteza că neanderthalienii nu ar putea fi predecesorii direcţi ai omului. Ei au început separarea din linia genetică a umanizării cu aproximativ 500 000 – 700 000 de ani în urmă şi au avut o evoluţie distinctă. Pe baza faptului că ADNmt al neanderthalienilor nu mai poate fi găsit astăzi la nici una dintre speciile actuale, s-a mai sugerat că neanderthalienii sunt o specie extinctă şi nici nu s-au încrucişat cu populaţiile predecesorilor omului actual, deşi au fost contemporani.
- Examinarea ADN-ul nuclear al reprezentanţilor omului de Cro-Magnon din Europa (ce a trăit în urmă cu circa 40.000 de ani) a relevat similitudinea secvenţelor sale, uneori identitatea, cu ADN-ul europenilor actuali.

c. Studiile ADN la populaţiile umane

Analiza comparativă a ADN la populaţiile umane actuale poate da informaţii privind trecutul nostru evolutiv şi migraţiile populaţionale.

> S-au studiat secvenţe (markeri) ADN pentru diferiţi loci autosomali dar în mod special markeri pentru ADN mitocondrial sau pentru regiunea non-recombinantă a cromosomului Y. ADNmt se transmite pe linie maternă şi nu se recombină în timpul meiozei; cromosomul Y se transmite pe linie paternă şi, exceptând regiunile PAR, nu se recombină în meioză. Deci, în aceste cazuri diversitatea genetică este generată numai de mutaţii. Dacă se consideră că rata mutaţiei este constantă în decursul timpului şi se corelează cu mărimea populaţiei, atunci se pot trasa în timp „originea şi călătoriile" rudelor noastre ancestrale.

S-au testat comparativ ADNmt provenite de la numeroase persoane din întreaga lume. Cu ajutorul unui computer s-a construit un arbore filogenetic ale cărui ramificaţii reprezentau relaţiile dintre tipurile de ADNmt testate. Plecând de la numărul minim de diferenţe observate între probe, s-au găsit strămoşi comuni şi, mergând înapoi, s-a ajuns în final la un singur strămoş comun al tuturor populaţiilor actuale, o femeie, „Eva ancestrală". Calculele bazate pe numărul de mutaţii au stabilit că ipotetica Eva a trăit în Africa, acum 140.000 – 200.000 de ani. Analiza ramificaţiilor acestui arbore (*Female Genetic Tree*) a evidenţiat existenţa a două ramuri fundamentale: una africană, întâlnită numai în Africa, şi alta care-i include atât pe africani, cât şi pe non-africani (figura 7.4).

Rezultatele studiilor asupra variaţiei cromozomului Y susţin datele analizelor ADNmt. S-a construit un arbore filogenetic (*Male Genetic Tree*) care arată că africanii şi non-africanii au un strămoş comun, un „tată fondator", numit Adam. Ipoteticul Adam a trăit în Africa, aproximativ în aceeaşi perioadă cu „Eva ancestrală". Aceasta nu înseamnă că în perioada respectivă existau numai „Adam şi Eva" ci că ADN-ul altor persoane ce trăiau concomitent cu ei în acelaşi areal nu s-a transmis la populaţiile actuale. Nu trebuie uitat că în genomul omului actual există şi alte gene, ceea ce nu exclude ca acestea să provină de la contemporanii lui „Adam şi ai Evei."

Adevărata semnificaţie a datelor furnizate de analiza ADNmt şi a cromozomului Y constă în aceea că plasează relativ recent (acum 100.000 sau 50.000 de ani) momentul migraţiilor populaţionale din Africa şi aduce argumente pentru ipoteza unicentrică („*out of Africa"*) a originii omului (vezi figura 7.2). Teoria evoluţiei prezice că populaţiile de origine, mai vechi, vor avea o diversitate mai mare decât populaţiile derivate, mai recente. Or, datele obţinute prin studiile ADN au arătat că diversitatea genetică a populaţiilor africane actuale este mult mai mare comparativ cu populaţiile non-africane.

> Populaţiile africane preistorice au avut efective mari de indivizi, au acumulat un număr mare de mutaţii, şi-au diversificat genofondul şi au evoluat local. Populaţiile non-africane actuale au apărut dintr-un grup sau grupuri mici de indivizi migratori. Diversitatea lor genetică mai redusă comparativ cu a africanilor s-ar datora faptului că iniţial, populaţiile migratoare au avut efective mici, iar timpul de evoluţie a fost scurt.

Totuşi, datele respective nu au reuşit să ofere un model exact al migraţiilor. Unii evoluţionişti cred că a fost o singură migraţie a populaţiei africane de „Adami şi Eve" din Africa spre celelalte continente, acum 50.000 de ani. Alţii consideră că au fost mai multe valuri migratorii: indivizi ai populaţiei ancestrale, formată din „Adami şi Eve", au început să

migreze, în grupuri mici, spre Asia de sud, posibil, şi spre Australia , acum 100.000 de ani (concordă cu opinia paleoantropologilor). Acesta este considerat primul val migrator şi corespunde primei ramificaţii a arborilor filogenetici alcătuiţi pe baza variaţiilor ADNmt şi a cromozomului Y. Un alt val migrator – poate cel mai important – a părăsit Africa în urmă cu circa *45.000* de ani şi s-au stabilit în Asia Centrală unde condiţiile de mediu au permis membrilor acesteia să se reproducă rapid. Cu 35.000 – 40.000 de ani în urmă, grupuri mici din Asia Centrală s-au îndreptat spre Europa unde au întâlnit populaţiile de neanderthalieni. Acum circa 20.000 de ani, grupuri mici de indivizi din Asia Centrală au migrat prin strâmtoarea Bering, spre America de Nord. Din acest motiv se afirmă că *„Africa este leagănul omenirii, iar Asia Centrală pepiniera ei”* (Figura 7.5).

CASETA 7.1 **Au existat Adam şi Eva?**

Analizele comparative ale ADNmt (transmis de femei) şi ADN cromosomului Y (transmis de bărbaţi) de la persoane din multiple populaţii umane actuale au permis construirea unor arbori filogenetici ipotetici care arată că fiecare din aceste molecule provin, în ultimă anliză, de la un strămoş comun – denumit firesc Eva şi, respectiv Adam – care au trăit acum circa 200.000 de ani, în Africa.

Interpretarea curentă a acestor date nu implică faptul că în perioada respectivă au existat *numai* „Adam şi Eva”; multe alte persoane trăiau concomitent cu ei, în acelaşi areal, dar ADN-ul acestora (mai exact ADNmt şi ADN Y) nu s-a transmis la populaţiile actuale. Probabil că alte gene autosomale din genomul omului actual provin de la contemporanii „lui Adam şi ai Evei”, dar acest lucru trebuie dovedit.

Există însă şi alte opinii care susţin descendenţa dintr-un cuplu unic sau poate mai multe, dar asemănătoare ca structura cromosomică; ele formează în esenţă *teoria cromosomică a originii umane.* Potrivit acestei teorii speciaţia este consecinţa unei remanieri cromosomice echilibrate întîmplătoare, compatibilă cu reproducerea. Un individ purtător al remanierii (deci heterozigot) o poate transmite la urmaşi; apoi printr-o uniune incestuoasă, de tip tată fiică sau frate-soră, se realizează un descendent homozigot normal; astfel apare primul reprezentant al unei noi specii. Speciaţia începe cu o pereche de indivizi ce au remanieri cromosomice identice. Un argument indirect pentru această teorie îl reprezintă faptul că maimuţele antropomorfe au 48 de cromosomi iar numărul de 46 de cromsomi de la om rezultă prin fuziunea telomerică a doi cromosomi de la primate. Rolul remanierilor cromosomice în evoluţie nu poate fi negat dar nici absolutizat.

Teoria cromosomică a originii umane este total diferită de *teoria populaţionistă*, baza evoluţionismului modern. Potrivit acesteia, formarea de noi specii se face în felul următor: o specie se scindează în mai multe populaţii şi fiecare populaţie – separată geografic şi izolată reproductiv de celelalte populaţii – evoluiază independent, acumulând mutaţii favorabile, pe care selecţia le fixează. Dar teoria are incertitudini: izolarea geografică este mai mult o supoziţie decît o realitate; speciaţia presupune un număr suficient de mare de mutaţii genice favorabile. Teoretic este mai puţin probabil ca în numărul relativ mic de generaţii a evoluţiei umane să fi apărut mutaţiile necesare transformării maimuţei în om; în aceeaşi perioadă bacteriile au rămas bacterii şi şoarecii au rămas şoareci. Nu trebuie însă să uităm că omul are o ereditate biologică şi una culturală, fiecare cu legile ei. Evoluţia umană a fost condiţionată de procese complicate culturale sau negnetice, adevărate resorturi ale supravieţuirii, ce au generat independenţă faţă de capriciile mediului ambiant. Nici o altă specie nu a mai creat vreodată o unealtă sau a utilizat focul. Fără cultură am fi rămas o specie care şi-ar mai căuta încă rosturile. Cultura este un atribut uman, ea ne-a separat de restul animalelor. Iar cultura i-a inventat pe Adam şi Eva

Pentru că suntem europeni, prin poziţia geografică, istorie şi tradiţii, ar fi interesant de adăugat unele amănunte despre populaţiile europene. Analiza ADNmt (Richards et al, 2000) şi a cromozomului Y (Semino et al, 2000) arată că Europa a fost populată de reprezentanţii omului modern mai târziu decât Africa, *aproximativ acum 45.000 de ani*. Majoritatea ADN al populaţiilor europene actuale provine de la *omul de Cro-Magnon* din ultima perioadă a *Paleoliticului superior*. O mică parte din ADN-ul europenilor actuali provine de la omul de Cro-Magnon timpuriu şi 10-25% din ADN-ul europenilor pare să provină de la oamenii moderni din Orientul Mijlociu şi Apropiat, din perioada Neoliticului (acum 10 000 de ani), când aceştia începuseră să practice agricultura. Compoziţia genetică a populaţiei europene actuale sugerează că în urma migraţiilor ulterioare, din Orientul Apropiat, populaţiile locale nu au fost înlocuite, ci s-a produs doar un amestec de gene.

Cu toate progresele înregistrate în ultimii ani, nu avem încă imaginea completă a evoluţiei, de la început şi până la sfârşit. Datele genetice nu sunt suficiente pentru a înţelege „de ce omul este om şi cimpanzeul este cimpanzeu", în condiţiile în care diferenţa genetică este atât de mică, iar implicaţiile ei sunt atât de mari.

3. "RASELE" UMANE

Toate fiinţele umane care trăiesc în prezent aparţin unei singure specii, Homo sapiens sapiens, deoarece din încrucişările lor rezultă de regulă descendenţi fertili. Este adevărat că specia noastră este neomogenă, politipică şi polimorfă, putându-se identifica mai multe grupuri populaţionale. Delimitarea lor, a fost realizată în trecut, de antropologia clasică, pe criterii morfologice deosebindu-se trei grupe populaţionale mari denumite rase: caucazienii (albi), negrii şi asiatici - fiecare cu numeroase subgrupuri diferite. În spiritul geneticii actuale rasele sunt definite, în general, ca fiind grupuri populaţionale mari care *au un fond comun de gene,* diferite de la un grup la altul. Deşi frecvenţele unor alele variază de la o populaţie la alta, s-a dovedit că frecvenţelor genice nu au o distribuţie superpozabilă delimitării clasice (morfologice) a raselor. Între membrii aceluiaşi grup rasial pot exista diferenţe mai mari decât între principalele rase. De fapt, *analiza genetică spulberă conceptul de rase umane distincte* dovedind faptul că distribuţia geografică şi populaţională a unor caractere genetice nu depinde de culoarea pielii, forma capului sau a corpului, etc. Se naşte o nouă paradigmă: "toţi suntem diferiţi, fiecare din noi este unic". La specia umană este inaplicabil conceptul de rasă biologică de la alte specii. El trebuie înlocuit cu noţiunea de populaţie.

Studiul variaţiei genetice a populaţiilor actuale a relevat faptul că *între oameni există mai multe asemănări decât deosebiri*. Altfel spus, *diversitatea genetică umană este limitată*. Afirmaţia este susţinută de rezultatele unui număr foarte mare de studii (folosind peste 10.000 de markeri genetici polimorfici), efectuate în ultimul deceniu, în cadrul Proiectului Diversităţii Genomice Umane (Human Genome Diversity Project), iniţiat în 1996. Datele obţinute (tabelul 7.4)au permis formularea unor concluzii:

- diversitatea genetică individuală în cadrul unei populaţii naturale depăşeşte cu mult diferenţele genetice dintre populaţii;
- cea mai mare diversitate genetică o prezintă populaţiile africane, ceea ce dovedeşte că acestea au cea mai mare vechime; populaţiile non-africane s-au separat relativ recent din ramura africană (acum 50.000 de ani);
- diversitatea genetică umană (atât cea nucleară, cât şi cea mitocondrială) este mai redusă comparativ cu cea observată printre primate şi alte specii animale.

Tabelul 7.4 Comparaţia diversităţii genetice şi lingvistice a populaţiilor umane continentale
(modificat după D.Nettle, 2001)

Conti-nent	ADN mt	Cromo som Y	Micro-sateliţi	Limbi vorbite	Timp (ani)

Africa	76,7	88	80,7	2011	130 000
Asia	36,7	78	68,5	2165	60 000
Europa	24,7	74	73,0	225	40 000
Oceania	41,8	72	63,6	1302	60 000
America	36,2	56	58,8	1000	15 000

Diversitatea genetică limitată a populaţiilor umane actuale a fost explicată prin *timpul scurt de evoluţie,* evenimetele demografice şi *schimburile genice* constante produse de migraţia populaţiilor. Se crede că populaţiile umane sunt genetic similare pentru că au origine recentă şi nu au avut timp suficient pentru a-şi dezvolta diferenţele genetice. *Efectivul numeric al unei populaţii* este important pentru dezvoltarea diversităţii genetice. În cursul evoluţiei umane, la un moment dat, a avut loc reducerea severă a numărului de indivizi din populaţia predecesoare omului modern (efect „*bottleneck*"), urmată de o expansiune numerică a acesteia. Momentul este plasat acum circa 45.000 de ani, atunci când o ramură a populaţiei de oameni moderni timpurii a migrat din Africa către Eurasia, generând populaţiile non-africane. Cu unele excepţii, populaţiile umane nu au fost niciodată izolate, migraţiile favorizând răspândirea genelor în cadrul populaţiilor.

Se pune totuşi firesc întrebarea: cum au apărut diferenţele morfologice dintre populaţiile umane? Baza genetică a diferenţelor genetice dintre populaţii ("rase") şi subpopulaţii este mutaţia iar mecanismele care determină aceste diferenţe sunt: *selecţia mutaţiilor* favorabile în funcţie de mediu; *fixarea întâmplătoare* a unor mutaţii neutre sau chiar defavorabile; *izolarea reproductivă* relativă între grupurile populaţionale (prin bariere geografice). Acum circa o sută de mii de ani (în cursul unei perioade de glaciaţie) continentul Euroasiatic, pe care s-au dezvoltat aşezări umane mici şi dispersate, a fost divizat în trei regiuni distincte, separate de zonele muntoase acoperite de gheaţă ale Muntilor Himalaya şi Altai. S-au creat bariere fizice care au întrerupt comunicaţiile şi încrucişările; în aceste regiuni, geografic şi deci genetic diferite una de alta, a apărut tendinţa de diversificare a speciei, de formarea a raselor, prin mecanisme selective specifice. În cele trei regiuni populaţiile au evoluat diferit determinând predominenţa albilor în vest, a asiaticilor (mongolilor) în est şi a negrilor în sud. Ulterior fiecare grup s-a subdivizat în numeroase subpopulaţii distincte, numite adesea grupuri etnice, cu caracteristicile proprii ale frecvenţei unor gene normale sau morbide. Evoluţia de formare a raselor a fost însă stopată, iar după părerea unor specialişti oprită, prin procesele de omogenizare ale speciei (determinate de mobilitatea oamenilor) şi progresele socio-culturale. S-a produs si se produce un amestec tot mai intens ale diferitelor grupuri care determină unificarea şi omogenizarea lor treptată determinânt caracterul unitar al umanităţii.

"Toate grupele umane, fie că este vorba de rase, în sens tradiţional, sau de populaţie/naţiuni în sens actual, au un fond genetic comun care le conferă aceleaşi capacităţi de dezvoltare intelectuală şi de progres social. Realizarea lor depinde de condiţiile istorice şi sociale ale fiecărui popor, ale fiecarei populaţii" (N. Botnariuc). Evident orice concepţie de inegalitate biologică implicată în evaluarea capacităţii evoluţiei şi dezvoltării diferitelor grupuri umane este neştiinţifică şi rasistă.

INTERNET

1. *Oameni fosili: http://www.neanderthal-modern.com/genetic3.html*
2. *Evolutia omului: http://www.talkorigins/faqs/homs/species.html*
3. *Genetica populaţiilor:* http://www.infobiogen.fr

Bibliografie specifică selectivă

1. Barbujani G, Magagni A, Minch E, Cavalli-Sforza L.L - *An apportionment of human DNA diversity* – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997;94: 4516-4519.
2. Gagneux P, Wills C, Gerloff U et al. – *Mitochondrial sequences show diverse evolutionary histories of African hominoides* – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999;96: 5077-5082.
3. Gibbons A - *Which og our genes make us human?* - Science, 1998; 281:1432-1434
4. Griffiths A, Gelbart W, Miller J, Lewontin R - *La génétique des populations et l'évolution*- in Analyse génétique moderne, Ed. DeBoeck Université, 2001, pg. 537-544

5. Harry M - *Histoire évolutive des hominines* - Structure génétique des populations în Génétique moléculaire et évolutive, Ed. Maloine, 2001
6. Hertl D - *Diversité phénotipique et variabilité génétique* - in Génétique des populations, Ed. Médicine-Sciences, Flamarion, 1994, pg. 5-20
7. Jorde LB, Bamshad M, Rogers AR. – *Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution* – BioEssay, 1998;20:126-136

CAPITOLUL 8

ROLUL FACTORILOR GENETICI ÎN PRODUCEREA BOLILOR

A. INTERACŢIUNEA DINTRE EREDITATE ŞI MEDIU ÎN PRODUCEREA BOLILOR

1. STAREA DE SĂNĂTATE ŞI BOALĂ

Sănătatea şi boala sunt greu de definit iar explicaţiile acestor „stări de viaţă" sunt complexe; nu există încă, iar după unii probabil nu va exista nciodată, o teorie generală care să le explice. După OMS, sănătatea este *„starea de bine şi confort fizic şi psiho-social, în absenţa unei boli sau infirmităţi manifeste clinic"*. Într-o accepţiune mai generală, sănătatea reprezintă o relaţie armonioasă între structurile şi funcţiile organismului uman. Acest fapt implică „un echilibru" şi „o menţinere constantă" a acestora, în condiţiile fluctuante ale mediului, deci o adaptare flexibilă şi permanentă. Capacitatea organismelor vii de a-şi *menţine*, prin procese de autoreglare neuro-endocrină complexă, o serie de caracteristici fiziologice *stabile*, îndeosebi la nivelul mediului intern, a fost denumită *homeostazie*. Conţinutul noţiunii de homeostazie a evoluat în timp, s-a îmbogăţit (în prezent se vorbeşte de o reglare programată şi una adaptativă) şi a căpătat mai multe faţete: pornind de la homeostazia fiziologică (concept introdus de Claude Bernard şi dezvoltată de Cannon şi Handerson), homeostazia imunologică şi apoi homeostazia genetică, s-a ajuns la homeostazia dezvoltării şi, mai recent, homeostazia socială şi culturală. Cert este că homeostazia este acum un concept mult mai larg şi, evident, un termen de referinţă pentru noţiunile de sănătate şi boală.

Orice alterare majoră a structurii şi/sau funcţiei normale a organismului, provocată de cauze exogene sau endogene, reprezintă o stare patologică sau o boală. Modificările structurale pot fi consecinţa unor tulburări de formare (plan greşit sau defecte de execuţie) sau a unor leziuni/distrugeri, prenatale sau postnatale, a unor structuri normal formate. În caz de boală, perturbările funcţionale implică depăşirea echilibrelor homeostazice (fiziologice, metabolice, imunologice etc).

Deşi variate prin cauze (etiologie), mecanisme de producere (patogenie) şi manifestări clinice (semne şi simptome, obiective şi subiective), bolile prezintă anumite caracteristici comune:

- *Cauzalitatea*; nu există boală fără cauză (chiar dacă aceasta nu este totdeauna evidentă, cunoscută). Agenţii cauzali sau factorii de boală – determinanţi şi favorizanţi – pot fi exogeni (biologici, chimici, fizici, psihologici, socio-economici) sau endogeni (genetici). În funcţie de numărul factorilor etiologici determinanţi se pot deosebi boli monofactoriale (genetice sau ecologice) şi multifactoriale (produse de acţiunea combinată, în proporţii diferite, a factorilor de mediu şi a factorilor genetici).

- *Existenţa unor reacţii de răspuns ale organismului la agresiune,* nespecifice sau specifice, generale şi/sau locale (uneori celulare). Aceste reacţii se sistematizează în *„mecanisme patogenice”* de boală, ce pot fi: informaţionale, neuro-endocrine, patochimice, energetice
- *Limitarea capacităţii de adaptare* a organismului la mediul extern sau socio-cultural; se realizează astfel „o incapacitate”, temporară sau definitivă.

2. CONCEPŢII DESPRE BOALĂ

În decursul timpului s-au confruntat două concepţii polare despre boală: una *esenţialistă* (promovată de William Osler) şi alta *nominală* (susţinută de Archibald Garrod, care a introdus conceptele de individualitate biochimică şi de susceptibilitate individuală). Aceste două alternative au influenţat profund *gândirea medicală* şi evoluţia medicinii.

a. Concepţia esenţialistă

- Fiecare boală este o entitate specifică. Ea apare întâmplător (ca *„un simplu fapt de viaţă”*, ca *„o eroare biologică”*) la o persoană anterior sănătoasă; are o cauză specifică şi se exprimă într-o formă relativ *constantă*, asemănătoare, la diferiţi bolnavi. Bolile infecţioase şi, paradoxal, bolile monogenice corespund perfect acestui „model”
- Bolnavul este considerat *„o maşină stricată”*, pe care medicul trebuie s-o repare. Or, toate maşinile sunt făcute *„după un proiect unic”* deci sunt relativ identice; nu interesează *„cine”* este bolnavul (poate fi „oricine”) şi, evident, de ce s-a îmbolnăvit.
- Medicul are două obiective (misiuni) principale – diagnosticul şi tratamentul bolii – ce derivă din întrebările: ce are bolnavul? şi cum trebuie tratat? Mentalitatea sa este eminamente inginerească: *„ce pană are maşina şi cum s-o repar”*. Tratamentul este direcţionat spre boală şi nu spre pacient, care nu este important în decizia terapeutică; deci tratamentul este relativ identic la toţi bolnavii. Este o crudă ironie faptul că medicina, o profesie atât de devotată îngrijirii indivizilor, le acordă, în această perspectivă de abordare, atât de puţină atenţie.

b. Concepţia nominală

- Descrie boala nu ca pe o entitate ci ca o *rezultantă* a interacţiunii (nepotrivirii sau incongruenţei) dintre individualitatea (unicitatea) biologică a pacientului (înţeleasă ca o anumită structură genetică şi o experienţă de viaţă particulară) şi agenţii cauzali, din mediu. Originea bolii are rădăcini în natura umanităţii şi istoria genetică şi ecologică a fiecărui individ (deci în susceptibilitatea lui specifică la boală, denumită mult timp *constituţie sau teren*). Devine astfel evident că *„NU există boli ci numai bolnavi!”*. Eventualele similitudini de manifestare la bolnavi diferiţi se datorează fondului comun de gene. Bolile multifactoriale, ce formează de fapt o mare parte a patologiei umane, corespund perfect acestui „prototip”; să nu uităm însă că apariţia şi evoluţia multor afecţiuni „ecologice” sunt influenţate de structura genetică a fiecărui individ (ce determină rezistenţa sau vulnerabilitatea la agresiune) şi nici că expresivitatea variabilă a bolilor genetice poate fi determinată de mediu.
- În concepţia „nominală” individul bolnav este pe primul plan, el fiind de fapt un ansamblu unic de gene, cu o anumită „istorie” (părinţi, familie), cu o anumită evoluţie în timp, cu „o experienţă” unică de viaţă (trăită într-o serie succesivă de medii specifice lui); el este, în momentul îmbolnăvirii, *„o persoană mai puţin adaptată la un anumit mediu”*, un om vulnerabil.
- Medicul trebuie, evident, să pună un diagnostic şi să trateze. Dar, în contextul individualităţii bolnavului, el trebuie să răspundă şi la întrebările, fundamentale în esenţa lor, „de ce *acest* pacient (şi nu altul) a făcut *această* boală (şi nu alta), „ce tratament este corespunzător *acestui bolnav*, individualităţii sale specifice”?

Cele două concepţii despre boală prezintă deosebiri fundamentale şi este logic să ne întrebăm care dintre ele este valabilă pentru medicina actuală şi, prin extensie, pentru învăţământul medical.

Este evident că prima, *concepţia esenţialistă* (Osleriană), bazată pe fapte şi acţiuni, a dominat medicina secolului 20 şi în mare măsură persistă şi astăzi, deoarece – chiar dacă ignoră individualitatea pacientului – ea a stat şi stă la baza practicii medicale şi învăţământului „la patul bolnavului". Boala este „un puzzle" pe care medicul trebuie să-l rezolve, mobilizându-şi simţurile, cunoştinţele de patologie şi experienţa. Pe medic îl interesează mai mult „faptele" (cum să practice medicina) şi nu „ideile".

Caracterul tipologic al concepţiei esenţialiste a dus la clasificarea bolilor în funcţie de etiologie, organ, vârstă, sex – fapt ce a determinat organizarea actuală a serviciilor medicale. Dezvoltarea tehnologiilor de diagnostic şi a metodelor de tratament a crescut eficienţa dar şi costurile medicale. Relaţiile dintre medic şi pacient au pierdut din umanism, întrucât tehnologia care se interpune între medic şi bolnav distorsionează modul în care fiecare îl vede pe celălalt. Prevenţia rămâne la periferia interesului medicului iar volumul enorm de date acumulate în ultimul timp – o povară pentru orice minte cuprinzătoare – a dus la fragmentarea medicinii în subspecialităţi, fără a se găsi o soluţie logică de a le ţine împreună. Educaţia medicală pare să sufere o eroziune permanentă prin neadaptarea la evoluţia rapidă a medicinii moleculare şi lipsa unei strategii, bazată pe o ierarhie de cunoştinţe şi pe dezvoltarea unei gândiri medicale.

Concepţia nominală (Garrodiană) se bazează pe concepte, principii şi idei care, în esenţă, ne învaţă cum *să gândim* în medicină. Înlocuind metafora „maşinii stricate" cu o concepţie etiopatogenică bazată pe individualitatea biologică, socială şi istorică, precum şi pe homeostazia biologică complexă (genetică, ontogenetică, funcţională, imună, socio-culturală) – această concepţie dezvoltă predicţia şi prevenţia (elementele cheie ale „medicinii omului sănătos"), umanismul şi bioetica.

Există suficiente argumente să optăm în medicina actuală pentru concepţia nominală, fundamentată prin dezvoltarea geneticii, care a demonstrat unicitatea şi diversitatea noastră precum şi existenţa unei „homeostazii moleculare". Dar credem că drumul este lung. Chiar dacă genetica a devenit „o parolă de acces" la medicina secolului 21, există motive să credem că genetica umană a fost mai curând „adaptată" la gândirea medicală existentă decât a contribuit la schimbarea ei. Fiind rezonabili este poate bine să spunem că adevărul este, ca de obicei, la mijloc şi că poate cea mai bună atitudine pentru medicul de astăzi este să aplice idealul concepţiei esenţialiste în domeniul practicii curente şi pe cel al concepţiei nominale în gândirea medicală. În acest context, abordarea genetică a devenit o nouă dimensiune în relaţia medic-pacient.

B. ECOGENETICA ŞI FARMACOGENETICA

Ecogenetica este partea geneticii medicale care studiază variaţiile individuale determinate genetic la acţiunea unor factori din mediu (Brewer, 1971). Aceste variaţii produc diferenţe de răspuns ale organismului uman la anumiţi agenţi ecologici şi deci vulnerabilităţi diferite la agresiune. Unele persoane vor fi mai susceptibile la îmbolnăvire iar altele mai rezistente. Substratul genetic al acestei variabilităţi este reprezentat în primul rând de polimorfismul genetic al unor loci care prezintă diferite variante alelice (la mai mult de 1% din populaţie), unele dintre ele asociindu-se cu un risc crescut de boală. Mai rar, variaţiile individuale sunt determinate de anumite mutaţii genice sau de intervenţia unui sistem poligenic, cu o distribuţie continuă cu prag.

În decursul timpului au fost evidenţiate multiple variaţii individuale la agresiunile externe, identificându-se diferite boli produse prin acţiunea combinată a unei susceptibilităţi genetice şi a unei expuneri specifice la anumiţi factori din mediu. Tabelul 8.1 sintetizează datele existente pentru cele mai cunoscute „boli ecogenetice". Cea mai dezvoltată parte a ecogeneticii actuale o reprezintă **farmacogenetica** care studiază variaţiile individuale determinate genetic la acţiunea unor medicamente (vezi secţiunea următoare). De asemenea, studiul susceptibilităţii la anumite infecţii capătă o nouă dimensiune.

Tabelul 8.1 Variaţii genetice în susceptibilitatea la agenţii din mediu

Agenţi din mediu	**Susceptibilitatea genetică**	**Afecţiuni**
Infecţii	Răspuns imunitar redus	Diferite boli infecţioase Diabet zaharat ? Spondilită?
Anumite componente din alimentaţie:		
- Lapte (lactoză)	- deficienţă în lactază	intoleranţa la lactoză
- Fructoză	- deficienţă în fructoz-1-fosfat aldolază	intoleranţă la fructoză
- Gluten	- sensibilitate la gluten	boala celiacă
- Grăsimi	- hipercolesterolemie	boală coronariană
- Acid folic	- creşterea homocisteinei în sânge datorită polimorfismului MTHFR şi deficienţă în folaţi	boală coronariană
	- deficienţă în folaţi; polimorfismul receptorilor de folaţi sau a MTHFR	defecte de tub neural
- Sare	- deficienţe ale pompei Na-K	hipertensiune arterială
- Suplimente de fier	- hemocromatoză	încărcare hepatică
- Oxalaţi	- hiperoxalurie	calculi renali
- Boabe de fava	- deficienţă în G6PD	anemie hemolitică (favism)
Alcoolul	- alcooldehidrogenază atipică	alcoolism
Diferite substanţe chimice		
- hidrocarburi policiclice (fum de ţigară)	- inducţia de aril-hidrocarbon-hidroxilază	Cancer pulmonar
- amine industriale	- acetilatori lenţi	Cancer de vezică
- pesticide	- polimorfismul paraoxonazei	Accidente după expunerea la organofosforate
Unele medicamente	- polimorfisme enzimatice	„accidente farmacogenetice” (vezi textul)
Pulberi ± fum ţigară	- deficienţă în α1-antitripsină	Emfizem pulmonar (BPOC)
Alergeni	- atopie	Astm bronşic
Radiaţii ultraviolete	- scăderea/lipsa melaninei - deficienţa enzimelor de reparare a ADN	Cancer cutanat Xeroderma pigmentosum, cancer cutanat

1. ECOGENETICA

Înainte de a prezenta câteva dintre domeniile ecogenetice este util de precizat că stabilirea unor biomarkeri corelaţi cu susceptibilitatea sau rezistenţa la anumite agresiuni din mediu are o valoare practică deosebită, pentru profilaxia îmbolnăvirilor. Spre deosebire de măsurile de prevenţie clasică, care se adresează unui grup din populaţie, identificarea persoanelor cu risc de îmbolnăvire – prin cercetarea unor markeri genetici – reprezintă o profilaxie „individualizată”, personalizată, ce ar putea fi mult mai eficientă. În acest context, se apreciază că aria ecogeneticii va creşte în importanţă în viitor, prin cercetarea corelaţiei dintre polimorfismele ADN şi riscurile pentru bolile comune ale adultului, ce implică şi o expunere a organismului la agenţi de mediu (în special cancer).

1.1. ECOGENETICA INFECTIILOR

Infecţiile sunt considerate ca prototip de boli ecologice şi acest lucru este, în mare parte, adevărat. Dar, din cele mai vechi timpuri s-a observat că vulnerabilitatea la anumite infecţii este diferită la persoane diferite *(”nu există ciumă ci ciumaţi...nu există lepră ci leproşi”) iar* manifestările şi gravitatea bolilor infecţioase variază în populaţie. Diferenţele individuale de susceptibilitate la infecţii erau atât de evidente încât l-au determinat pe Claude

Bernard să afirme, la sfârşitul secolului 19 – în plină perioadă de "euforie" la descoperirile lui Pasteur – că *"microbul nu-i nimic, terenul este totul"*.

Desigur, rezistenţa sau vulnerabilitatea la infecţii sunt multifactoriale; un rol important îl au vârsta, starea de nutriţie, statusul socio-economic etc., dar elementul major îl reprezintă imunitatea, determinată genetic. Variabilitatea populaţională şi individuală a structurilor determinate genetic ce participă la realizarea imunităţii reprezintă explicaţia majoră a diferenţelor în susceptibilitatea la infecţi; un exemplu ilustrativ îl reprezintă predispoziţia genetică la tuberculoză (caseta 8.1).

În fond, orice infecţie poate fi considerată "un conflict de interese", o confruntare între individualitatea genetică a gazdei, ce produce grade diferite de rezistenţă, şi individualitatea genetică a bacteriei, ce determină patogenitatea şi virulenţa ei. Argumentele sunt numeroase, cele mai bine studiate exemple fiind sumarizate în tabelul 8.2. Dintre acestea vom reţine, pentru importanţa lor:

- studiul polimorfismelor antigenelor HLA în diferite boli infecţioase (tuberculoză, hepatită, SIDA, febră tifoidă, lepră, etc) au permis identificarea unor combinaţii antigenice ce se corelează cu un răspuns imun slab sau puternic;
- pierderea funcţiei receptorului citokinic CCR5, "poartă de intrare" pentru virusul imunodeficienţei umane (HIV), se asociază cu rezistenţa la infecţia cu HIV.

Tabelul 8.2. Exemple de polimorfisme genetice care modifica susceptibilitatea la unele infectii umane (modificat după Cooke şi Hill, 2001)

Gena (varianta alelică)	Localizarea cromosomică	Proteina codificată	Boala	Efectul asupra bolii
HLA I B8 B35 B53 B57	6p21.3	Antigene leucocitare umane clasa I	 Tuberculoza pulmonară SIDA Malaria severă SIDA	 Susceptibilitate Susceptibilitate Rezistanţă Rezistenţă
HLA II DRB1*1302 DRB1*1352 DRB1*1101 DRB1*04 DR2 DR2 DR7	6p21.3	Antigene leucocitare umane clasa II	 Hapatita B Anemia asociată malariei Hepatita C Febra tifoidă Tuberculoza pulmonara Lepra, Hepatita B	 Rezistenţă Rezistenţă Rezistenţă Susceptibilitate Susceptibilitate Susceptibilitate
CCR2[V62I]	3p21	Receptor chemokinic cu motiv CC, tip 2	SIDA	Incetinirea progresiei
CCR5[32bpdel]	3p21	Receptor chemokinic cu motiv CC, tip 5	SIDA	Progresie accelerata
CD36[T1264G]	7q11.2	Receptor plachetar pentru trombospondină	Infecţia cerebrală în cadrul malariei	Susceptibilitate
DARC	1q22	Receptor chemokinic (antigenul de grup sanguin Duffy)	Infecţia cu *Plasmodium vivax*	Susceptibilitate
ICAM1[K29M]	19p13.3	Molecula de adeziune intercelulara tip 1	Infecţia cerebrală în cadrul malariei cu *P. falciparum*	Susceptibilitate
IL10[-592C>A]	1q31-q32	Interleukina tip 10	Hepatita B SIDA	Infecţie persistentă Susceptibilitate
IFNGR1 [S395X] [-56C>T]	6q23-q24	Receptor tip 1 al interferonului gamma	Infecţii micobacteriene atipice; infectia cu *H. pylori*	Susceptibilitate
MBL2[G54D]	10q11.2-q21	Lectina de legare la manoză	Meningita meningococică	Susceptibilitate
NRAMP1 sau SLC11A2	2q35	Transportor de cationi divalenţi	Lepra Tuberculoza pulmonară	Susceptibilitate

Gena (varianta alelică)	Localizarea cromosomică	Proteina codificată	Boala	Efectul asupra bolii
SDF1[801G>A]	10q11.1	Factorul 1 derivat din celulele stromale	SIDA	Rezistenţă
STAT1[K706S]	2q32.2	Transductor al semnalului şi activator al transcriptiei tip 1	Infecţii micobacteriene atipice	Susceptibilitate
TNFA [-376G>A] [-308G>A]	6p21.3	Factorul de necroză tumorală tip alfa	Infecţia cerebrală în cadrul malariei; şoc septic	Susceptibilitate Susceptibilitate
VDR	12q12	Receptorul pentru vitamina D	Tuberculoza pulmonară	Rezistenţă

Din această perspectivă infecţiile încetează să fie boli "pur ecologice" şi devin, ca şi alte afecţiuni multifactoriale, consecinţa incongruenţei, nepotrivirii, dintre genotip şi mediu sau rezultanta interacţiunii lor.

CASETA 8.1

Predispoziţia genetică la tuberculoză

După cum se ştie, tuberculoza este o boală infecţioasă cronică produsă de *Mycobacterium tuberculosis*, şi care, reprezintă o problemă de sănătate publică, întrucât circa 1/3 din populaţia globului este infectată cu *M.tuberculosis*; potrivit OMS, în 1998 s-au înregistrat 8 milioane cazuri noi de tuberculoză clinică şi 1,9 milioane de decese prin tuberculoză. În aceste condiţii este firesc ca boala şi agentul patogen să fie în centrul atenţiei cercetătorilor.

S-a stabilit că genomul *M. tuberculosis* (4,5 milioane pb) are circa 4000 de gene, dintre care aproximativ 90% au funcţie cunoscută, codificând învelişul lipidic, factorii de patogenitate (genele *mce, sigA, erp etc*), factorii de supravieţuire intracelulară sau de rezistenţă la anumite medicamente.

Infecţia cu *M. tuberculosis* şi tuberculoza clinică rezultă prin interacţiuni complexe între agentul infecţios, factorii de mediu şi gazdă; cert este că nu toţi indivizii expuşi la *M. tuberculosis* devin infectaţi şi numai circa 10% din numărul mare de indivizi infectaţi dezvoltă tuberculoza clinică; există deci o susceptibilitate genetică la această boală.

Studiile privind controlul genetic al imunităţii antimycobacteriene şi al tuberculozei clinice se pot grupa în trei categorii:

- *Asocierea dintre tuberculoză şi anumite gene ce codifică proteine implicate în imunitatea antimycobacteriană;* studii populaţionale, efectuate în diferite ţări, au evidenţiat asocieri cu: proteina fixatoare de manoză (în *India*), interleukina-1 beta (în *Gujarti*), NRAMP1 – proteina macrofagică asociată cu rezistenţa naturală (în *Gambia*), anumite alele HLA clasa II, receptorul vitaminei D. Aceste studii pledează pentru o *predispoziţie poligenică* complexă; alelele implicate au însă un rol funcţional incert şi efecte moderate.
- *Sindromul de susceptibilitate la infecţiile mycobacteriene* produs de mutaţii rare[1], cu transmitere *monogenică*, ce produc forme severe de tuberculoză;
- *Identificarea unor gene majore de susceptibilitate la tunerculoza clinică*; recent (Greenwood et al, 2000) a fost identificată (într-o populaţie autohtonă din Canada neexpusă anterior la tuberculoză) o genă care determină un risc crescut (x10) de boală. Gena de susceptibilitate a fost localizată în regiunea cromosomică 2q35**,** în care se află şi gena *NRAMP1***.** Nu se stie încă dacă gena de susceptibilitate este *NRAMP1* sau o altă genă din imediata apropiere. Gena *NRAMP1* este un bun candidat deoarece omologul ei la şoareci reglează faza iniţială a infecţiei mycobacteriene; la om această genă ar controla progresia de la starea de infectat (indivizi cu test cutanat pozitiv la tuberculină) la starea de afectat (indivizi cu boală). În alte populaţii, cu un istoric de expunere intensă la tuberculoză, genotipurile susceptibile au dispărut rapid şi probabil alte gene polimorfice , cu efecte medii, pot predispune la îmbolnăvire într-o modalitate mai puţin evidentă.

[1] Mutaţiile se produc în genele implicate în imunitatea mediată de interferonul gama sau funcţia fagocitelor, limfocitelor T

Natura susceptibilităţii genetice la tuberculoză nu este încă elucidată şi nu este exclus ca diferite alele ale unei/câtorva gene să fie implicate în toate cele trei situaţii descrise mai sus. Cercetările având ca obiectiv înţelegerea controlului genetic al imunităţii antimycobacteriene continuă deoarece au implicaţii biologice majore şi deschid o nouă cale de a combate tuberculoza: detecţia precoce şi urmărirea prelungită a indivizilor cu risc crescut şi introducerea unor noi terapii (de exemplu, de restaurare a unei deficienţe parţiale a răspunsului imun).

Variabilitatea/diversitatea genetică umană a fost un avantaj evident al populaţiilor umane confruntate cu infecţii devastatoare, care n-au putut fi integral decimate nici de marile epidemii ale Evului Mediu. Dar polimorfismul actual al unor markeri biologici şi predominanţa unor boli genetice în anumite populaţii pot fi corelate, într-o oarecare măsură, şi cu selecţia naturală produsă de bolile infecţioase. Este bine cunoscut avantajul selectiv (rezistenţa la infestarea cu Plasmodium falciparum) al heterozigoţilor pentru diferite gene ale căror mutaţii produc hemoglobine anormale (HbS, Hb C, talassemie etc) sau G6PD faţă de malarie, acest mecanism selectiv explică frecvenţa crescută a hemoglobinopatiilor în anumite populaţii ce trăiesc în zonele (tropicale) în care malaria este endemică (figura 8.1). Intens studiată şi ilustrativă pentru selecţia naturală produsă de infecţii este variaţia geografică a anumitor grupe sanguine ABO: frecvenţa crescută a grupei O în America Centrală şi de Sud a fost corelată cu rezistenţa persoanelor cu acest grup sanguin la sifilis; în schimb frecvenţa scăzută a persoanelor cu grup sanguin O în Europa a fost pusă pe seama vulnerabilităţii lor la ciumă şi holeră[2]. Predominanţa grupului B în Asia Centrală si de Sud s-a explicat prin acţiunea combinată a vulnerabilităţii persoanelor cu grupa A la variolă şi a celor cu grupa O la holeră.

1.2. ECOGENETICA NUTRIŢIONALĂ

Cel mai cunoscut exemplu privind diferenţele genetice la alimente îl reprezintă absenţa (la copii) sau reducerea (la adulţi) a activităţii **lactazei intestinale** care produce intoleranţa la lactoza din lapte sau din alte produse lactate (OMIM 150220), manifestată în special prin diaree severă. În aceeaşi „zonă" se plasează şi boala celiacă în care se produce o malabsorbţie a unor alimente datorită sensibilizării la gluten (intoleranţa intestinală la gliadină şi proteinele înrudite prezente în cereale). Alte boli ecologice produse de unele substanţe din alimentaţie sunt menţionate în tabelul 8.1. Ne vom referi în continuare la variaţii în susceptibilitatea la boala (ateroscleroza) coronariană corelate cu alimentaţia. Nivelul colesterolului sanguin depinde de alimentaţie dar poate fi influenţat şi de mutaţia unor gene, dintre care cea mai frecventă este a genei pentru receptorul LDL ce produce hipercolesterolemia familială (OMIM 143890) (vezi şi capitolul 13).

Recent, un alt factor de risc pentru boala coronariană a început să fie amplu analizat: nivelul sanguin ridicat al aminoacidului **homocisteina**. Există două erori înăscute de metabolism ce produc creşterea nivelului de homocisteină: homocistinuria (OMIM 236250) şi deficienţa în metilen-tetrahidrofolat-reductaza (MTHFR) (OMIM 236250). Dar cea mai frecventă cauză a hiperhomocisteinemiei este polimorfismul enzimei MTHFR. O alelă ce codifică o enzimă termolabilă asociată cu ingestia alimentară redusă de acid folic poate produce creşterea nivelului homocisteinei şi riscul pentru boală coronariană. Mai multe studii au arătat că 17-28% dintre bolnavii coronarieni sunt homozigoţi pentru gena ce codifică această variantă enzimatică. Tinând cont de frecvenţa bolii coronariene devine evidentă că suplimentarea alimentară cu acid folic (prezent în făină şi produse de cereale) ar putea contribui la scăderea nivelului homocistenei.

O altă aplicaţie benefică a suplimentării cu **acid folic** ar putea fi efectul protector faţă de anumite malformaţii congenitale. În unele studii populaţionale administrarea de acid folic

[2] Frecvenţa crescută a fibrozei chistice în populaţiile din Europa a fost corelată cu avantajul selectiv al heterozigoţilor pentru aceleaşi boli infecţioase, ciuma şi holera

înaintea concepţiei şi în primele luni de sarcină ar reduce cu circa 50% riscul naşterii unor copii cu defecte de tub neural şi malformaţii cardiace. Foarte probabil polimorfismul enzimelor ce influenţează absorbţia sau metabolismul folaţilor poate face ca anumite persoane să aibă un risc crescut la aceste malformaţii; în aceste condiţii depistarea persoanelor susceptibile şi suplimentarea periconcepţională cu acid folic ar putea avea efecte profilactice benefice.

În cadrul ecogeneticii „nutriţionale" vom include şi variaţiile genetice în metabolizarea *alcoolului*, deşi opiniile privind încadrarea alcoolului printre alimente sau printre droguri se confruntă şi în prezent. Cert este că un consum exagerat, dependenţa de alcool – **alcoolismul** – şi consecinţele lor sunt o mare problemă de mare actualitate, care are mai mult o cauzalitate socio-economică. Există totuşi studii ce implică şi intervenţia unor factori genetici. Nu ne vom referi la studiile familiale sau la cele efectuate pe gemeni şi copii adoptaţi care validează prevalenţa crescută a unor „probleme" dependente de alcool printre rudele bolnavilor alcoolici, deoarece nu poate fi exclus un „model comportamental" familial dar dobândit. Vom preciza numai că enzimele implicate în metabolizarea hepatică a alcoolului prezintă un polimorfism ce poate explica variaţiile individuale (şi uneori populaţionale/etnice) în răspunsul organismului şi în eliminarea alcoolului, inclusiv în apariţia bolilor legate de alcoolism: ciroza hepatică, sindromul Korsakov sau sindromul alcoolismului-fetal (FAS). Alcoolul este transformat în ficat în aldehidă (sub acţiunea unei alcooldehidrogenaze; ADH) iar aceasta este apoi degradată prin intervenţia unei aldehid-dehidrogenaze (ALDH). ADH este un dimer realizat prin combinarea a trei tipuri de subunităţi: α- codificată de gena ADH1, β- codificată de gena ADH2 şi γ-codificată de gena ADH3; unele combinaţii, în special a subunităţilor β şi γ, au o eficienţă metabolică mai redusă şi pot duce la o stare toxică la consumul unor cantităţi mici de alcool. Şi ALDH prezintă două variante enzimatice: ALDH1 şi ALDH2. Interesant este faptul că deficienţa de ALDH2 produce, chiar la cantităţi mici de alcool, o congestie/înroşire facială şi o stare acută de disconfort, inclusiv cefalee. Astfel, indirect, persoanele respective – cu toleranţă mică la alcool – sunt „protejate" faţă de alcoolism. Datele actuale privind polimorfismul enzimelor implicate în metabolismul alcoolului argumentează diferenţele individuale în răspunsul organismului la consumul de alcool.

1.3. ECOGENETICA CHIMICĂ

În cursul vieţii, celulele organismului sunt supuse la o mare varietate de agenţi chimici toxici – de origine endogenă (de exemplu, radicali liberi de oxigen) sau exogenă – care pot interfera cu structura sau metabolismul celular, inclusiv cu genomul. Astfel, se apreciază că 2/3 din cancere sunt produse de agenţi din mediu, în majoritate chimici. În consecinţă organismele vii au dezvoltat mecanisme de detoxifiere, protecţie şi, eventual, reparare a leziunilor. Sistemele de detoxifiere acţionează, în general, în două faze (figura 8.2). O primă reacţie enzimatică produce *metaboliţi intermediari* ce posedă un compus reactiv puternic destinat ca în a doua etapă să realizeze *conjugarea* cu glutationul sau un alt grup chimic, de exemplu acetil (prin acetilare), care să determine o mai mare solubilitate şi o excreţie eficace (vezi şi secţiunea B.2.1). Trebuie însă subliniate două elemente:

- agentul chimic ajuns în organism – prin inhalaţie (fumul de ţigară, ş.a), pe cale digestivă, prin contact cu diferite mucoase – *induce* expresia unor gene ce codifică enzimele necesare transformării sale în prima etapă a detoxifierii;
- metaboliţii intermediari produşi sunt mult mai reactivi, în special faţă de ADN, decât compuşii primari şi deci mai mutageni şi cancerigeni. Ei pot produce necroză celulară sau pot genera o clonă celulară anormală, ce duce la o proliferare tumorală.

Organismul este capabil să se apere şi faţă de aceste efecte celulare secundare fie prin sistemul imun, care poate elimina celulele canceroase, fie prin inducerea apoptozei. În această schemă generală, prin care organismul încearcă să neutralizeze efectele unor agenţi chimici

din mediu, intervin numeroşi şi variaţi compuşi proteici, codificaţi de gene. Mutaţia acestor gene produce variante alelice care pot determina o susceptibilitate crescută sau o rezistenţă la anumite boli, în special cancere. Vom analiza rolul acestor variaţii individuale determinate genetic în diferite etape ale biotransformării compuşilor chimici exogeni (vezi figura 8.2)

(1) În procesul de transformare a substanţelor chimice din mediul extern în produşi intermediari intervine în special familia proteinelor citocromului P450 (codificată de genele *CYP*), un veritabil „scut metabolic". Aceste proteine prezintă un polimorfism important ce determină în ultimă instanţă un risc crescut sau scăzut la leziuni celulare, inclusiv la nivelul ADN.

- Hidrocarburile policiclice, mai ales din fumul de ţigară, induc expresia genei *CYP1A1* care codifică o enzimă – aril-hidrocarbon-hidroxilază – ce produce transformarea lor într-un epoxid mai uşor de eliminat din organism dar mult mai cancerigen. Intensitatea metabolizării hidrocarburilor policiclice este controlată genetic de diferite alele ale genei *CYP1A1*. Alela „puternic inductibilă" codifică o variantă enzimatică cu activitate crescută. Fumătorii homozigoţi pentru această alelă au un un risc de 7 ori mai mare de a dezvolta cancer pulmonar comparativ cu homozigoţii pentru alela „slab inductibilă", ce codifică o enzimă puţin eficace în transformarea hidrocarburilor.
- O altă enzimă din familia citocromului P450 este CYP2D6(codificată de o genă situată pe 22q) implicată în oxidarea unor substanţe (numeroase medicamente, inclusiv beta-blocantul *debrisoquină*, primul studiat). Varianta „metabolizator lent" determină o rezistenţă crescută la efectul potenţial cancerigen al fumului de ţigară sau a unor cancerigeni industriali (azbest, amine aromatice); în schimb varianta „metabolizator intens" determină un risc crescut (de 18 ori) de cancer pulmonar[3] şi de vezică urinară. Aceeaşi variantă, implicată în detoxifierea neurotoxinelor, se corelează cu un risc crescut pentru boala Parkinson.

(2) Conjugarea produşilor intermediari cu glutationul sau gruparea acetil poate fi redusă la anumite persoane, ducând la acumularea acestor produşi înalt reactivi.

- Astfel variaţiile activităţii *glutation-S-transferazei* (GSTM1) se corelează cu un risc crescut (activitate enzimatică nulă sau scăzută) sau scăzut (protecţie) la anumite cancere; de exemplu, s-a stabilit că circa 70% din bolnavii cu cancer de colon proximal nu au activitate GSTM1. Persoanele care combină genotipul nul pentru *GSTM1* şi alela *CYP1A1* cu activitate crescută au un risc relativ de cancer de 30 ori mai mare decât cei care nu prezintă aceste caracteristici.
- *Acetilatorii lenţi* au un risc crescut de cancer vezical dacă fumează sau sunt expuşi la amine aromatice; ei au deasemeeai un risc crescut de cancer colorectal dacă în alimentaţia lor se află produşi potenţial cancerigeni (rezultaţi frecvent prin anumite metode de preparare).

(3) Produşii intermediari intens reactivi pot produce leziuni ale ADN (mai ales la cei cu deficienţe relative ale enzimelor de reparare, cum ar fi heterozigoţii pentru gena ATM sau persoanele cu mutaţii ale genelor BRCA 1 şi 2; vezi capitolul 6.B.4), activarea unor oncogene sau mutaţii ale genei *TP53* ce codifică proteina p53, „gardianul" genomului uman (de exemplu, mutaţia codonului 249 în cancerul de ficat la subiecţii expuşi la aflatoxina B1, toxină produsă de ciupercile din genul *Aspergillus,* ce pot contamina unele alimente).

(4) Proliferarea celulelor ce au suferit leziuni genomice este facilitată probabil de anumite deficienţe imunologice, determinate genetic.

Datele prezentate argumentează convingător existenţa unei susceptibilităţi diferite la cancerigeni a unor persoane diferite. Deşi bazele genetice şi biochimice ale vulnerabilităţii sau rezistenţei la cancerele induse de factori din mediu necesită noi cercetări, consecinţele benefice pentru sănătatea publică ale identificării persoanelor cu risc crescut sunt evidente.

---

[3] În unele studii 70-80% din bolnavii cu cancer pulmonar sunt „metabolizatori intenşi" (sau oxidatori rapizi) pentru *CYP2D6.*

În contextul ecogeneticii chimice ne vom referi, tangenţial, la un subiect deja abordat (vezi capitolul 6.D.1.3): *polimorfismul α_1-antitripsinei*. Variantele SS şi ZZ, datorită unor substituţii de aminoacizi în situsul activ al enzimei, au o activitate antiprotează redusă la 60% şi respectiv 10% realizând o deficienţă de α_1-antitripsină (OMIM 107400). Această reducere a activităţii inhibitorilor favorizează acţiunea elastazelor, eliberate în procesul inflamator, asupra elastinei din pereţii alveolelor pulmonare; degradarea elastinei determină emfizem pulmonar. Progresia bolii este mult accelerată la fumători deoarece fumul de ţigară oxidează metionina 358 din situsul activ al enzimei şi astfel îi reduc afinitatea pentru elastază de circa 2000 de ori. Acesta este unul din cele mai clare exemple de „boală ecogenetică".

1.4 ECOGENETICA FIZICĂ

Radiaţiile ultraviolete solare reprezintă cauza principală a cancerului cutanat la toţi indivizii dar mai ales la cei care au o cantitate redusă de melanină, pigmentul ce absoarbe razele UV. De aceea, persoanele blonde sau cu albinism (OMIM 203100) au o vulnerabilitate mai mare la cancer cutanat. La acest grup se adaugă cei cu defecte ale enzimelor de reparare a ADN, cum ar fi bolnavii de xeroderma pigmentosum (OMIM 278700) (vezi capitolul 6.B.4.1). Probabil că studiile viitoare ale polimorfismul normal al enzimelor de reparare va aduce date suplimentare pentru identificarea persoanelor vulnerabile la cancere în general şi cancer cutanat în special.

2. FARMACOGENETICA

Evaluarea efectelor terapeutice ale medicamentelor a permis, în timp, constatarea unor diferenţe în acţiunea lor la bolnavi diferiţi suferind de aceeaşi boală, precum şi a unor reacţii adverse, neaşteptate, care uneori erau fatale. Aceste variaţii individuale pot fi produse de factori multipli – vârstă, sex, boală, interacţiuni medicamentoase etc – dar o serie de observaţii clinice au dus la concluzia că factorii genetici („*individualitatea biochimică"* după Garrod, 1909) influenţează decisiv metabolismul şi deci eficacitatea medicamentului precum şi producerea unor *reacţii adverse*[4]. Astfel, în 1950 se descoperă sensibilitatea la primachin (la subiecţii cu deficienţă în G6PD), metabolizarea lentă a izonoazidei (la unii bolnavi de tuberculoză) şi apneea prelungită la succinilcolină; toate aceste caracteristici legate de acţiunea medicamentelor se transmit ereditar. Treptat, prin noi descoperiri, a devenit evident că, foarte probabil, orice cale de metabolizare a medicamentelor poate prezenta variaţii genetice[5] iar aceste variaţii sunt *frecvente* şi au incidenţe diferite, uneori importante, în grupuri populaţionale diferite. Pe această bază Motulsky (1957) şi Vogel (1959) introduc conceptele şi termenul de *farmacogenetică – domeniu de studiu a variaţiilor individuale determinate genetic la acţiunea medicamentelor*[6].

Conceptul de farmacogenetică îşi are originea în observaţiile clinice ale unor pacienţi cu *concentraţii* plasmatice sau urinare crescute sau scăzute ale unor medicamente; apoi s-a stabilit că *modificările* chimice care produc aceste variaţii sunt ereditare şi abia mai târziu s-au identificat *enzimele* implicate în metabolizarea medicamentelor, genele care le codifică şi variantele lor *alelice* (deci variaţii în secvenţa ADN) asociate cu caracterul ereditar respectiv. În aceste condiţii şi ţinând cont de frecvenţa semnificativă a polimorfismelor genetice în populaţiile umane, s-a ajuns la ideea că dezvoltarea farmacogeneticii, într-o variantă modernă

---

[4] Incidenţa reacţiilor adverse la medicamente este de 6-7% în SUA, majoritatea fiind determinate genetic

[5] O proporţie însemnată – 20-95% - din variabilitatea individuală a răspunsului la acţiunea medicamentelor este determinată de ereditate.

[6] Unii autori consideră, într-o definiţie mai largă, că farmacogenetica se ocupă de studiul variaţiilor genetice individuale la acţiunea tuturor substanţelor chimice exogene, a xenobioticelor. Totuşi, există un consens actual de a restrânge firesc domeniul farmacogeneticii la medicamente şi de a-l considera ca o parte a ecogeneticii care studiază variaţiile individuale determinate genetic la acţiunea factorilor de mediu.

de *farmacogenomică*, ar putea să permită în viitor – prin folosirea unor teste adecvate – stabilirea drogului şi/sau dozei corespunzătoare pentru fiecare pacient...sau, pe scurt, *personalizarea* medicaţiei („medicamentul potrivit pentru pacientul potrivit").

Apariţia farmacogeneticii a adus însă în discuţie o problemă deosebit de interesantă: *originea polimorfismelor* ce determină răspunsul variabil la droguri şi *mecanismul menţinerii lor*, deoarece era evident că ele au apărut înaintea folosirii drogurilor şi nu „ca raspuns" la utilizarea lor. Deoarece enzimele implicate în biotransformarea drogurilor participă şi la metabolizarea substanţelor alimentare obişnuite, se consideră că polimorfismele au apărut în populaţii diferite ca urmare a presiunii selective alimentare. Aceasta explică şi frecvenţa lor diferită în grupuri etnice diferite.

Studiile variaţiilor normale în răspunsul la medicamente al indivizilor dintr-o populaţie pot da informaţii privind *natura* determinismului genetic:

- o distribuţie discontinuă, bimodală sau trimodală, indică o ereditate monogenică (de exemplu, o enzimă codificată de alelele unui singur locus polimorfic); *curba bimodală* (figura 8.3) se observă atunci când în populaţie există indivizi homozigoţi hipometabolizatori, purtători ai unei mutaţii inactivatoare şi indivizi normo- sau hipermetabolizatori, care au un genotip normal; dacă heterozigoţii realizează o grupă separată între cele două tipuri de homozigoţi atunci distribuţia este trimodală.
- o distribuţie continuă – o *curbă de tip gaussian* – reflectă un determinism multifactorial, deci o combinaţie a factorilor genetici şi de mediu; ponderea acestor elemente este apreciată prin studiul gemenilor; mediana acestei curbe a fost desemnată drept LD50 (*lethal dose* - doza letală - pentru 50% dintre subiecţi).

Orice medicament administrat unui pacient este *absorbit* şi apoi *transportat* şi *distribuit* la situsurile sale de acţiune, unde *va interacţiona* cu ţintele terapeutice, receptori sau enzime; aici va suferi *transformări* în *metaboliţi* (care sunt mai solubili în apă şi mai uşor de eliminat) şi în final va fi *excretat*; uneori produsul iniţial este convertit în compuşi terapeutici activi iar alteori se pot produce metaboliţi toxici, ce trebuie neutralizaţi. Fiecare dintre aceste procese poate fi potenţial influenţat de variaţii genetice semnificative clinic; ele se grupează în două categorii:

- **variabilitatea farmacocinetică** care se referă la diferenţele privind absorbţia, rata de metabolizare şi eliminare a medicamentului şi a catabolitilor săi; aceasta influenţează relaţia doză-concentraţie plasmatică şi relaţia doză-concentraţie tisulară;
- **variabilitatea farmacodinamică** ce include polimorfismele proteinelor implicate în transportul medicamentelor în organism şi ale ţintelor terapeutice (receptori, enzime); aceastea influenţează direct relaţia doză-efect.

2.1 FARMACOGENETICA METABOLISMULUI MEDICAMENTELOR

Farmacologii au stabilit că în procesele (căile) de metabolizare ale medicamentelor există, principial[7], două etape:

- Faza I de *biotransformare*, prin reacţii de oxidare, dehidrogenare, hidroliză etc;
- Faza II de *conjugare*, prin reacţii de acetilare, glucuronidare, sulfatare, metilare etc.

Primele observaţii clinice de "afecţiuni farmacogenetice" datează de circa 50 de ani când a fost descrisă o perturbare a unei reacţii de fază I – *hidroliza succinilcolinei* (un relaxant muscular folosit în chirurgie), de către butirilcolinesterază (pesudocolinesterază); subiecţii cu o formă atipică de enzimă nu pot hidroliza succinilcolina fapt ce determină o prelungire a paraliziei musculare indusă de medicament şi apnee. Această caracteristică se transmite ereditar, autosomal recesiv.

Aproape în aceeaşi perioadă a fost observată şi o variaţie genetică în faza II de metabolizare a medicamentelor prin *acetilare*. Concentraţia plasmatică a unor medicamente metabolizate de către N-acetiltransferază (isoniazida – un agent tuberculostatic, hidralazina – un antihipertensiv, procainamida – un drog antiaritmic) prezintă variaţii individuale la subiecţii cu acetilare lentă sau rapidă, care au

[7] Aceste faze nu sunt obligatoriu respectate: faza I poate lipsi uneori sau faza II poate precede faza I.

consecinţe clinice. Aceste exemple de variaţii individuale farmacogenetice au dus la amplificarea studiilor variabilităţii genetice în alte căi de biotransformare ale medicamentelor.

a. Farmacogenetica fazei I de transformare a medicamentelor.

Cele mai importante enzime implicate în faza I de metabolizare a medicamentelor sunt enzimele din superfamilia **citocromului P-450**. Dintre acestea, **CYP2D6** sau citocromul P-450 2D6 prezintă un polimorfism genetic ce influenţează metabolizarea multor medicamente (tabelul 8.3) şi determină diferenţe individuale ale efectelor farmacocinetice şi terapeutice.

Tabelul 8.3. Polimorfisme genetice care afectează raspunsul la o serie de medicamente

Enzima (varianta alelică)	*Localizare cromosomică*	*Frecvenţa metabolizatorilor slabi*	*Exemple de droguri metabolizate*	*Efectul administrării drogului*
Enzime de clasa I				
CYP2D6[*2A, *3, *4, *5, *6, *10, *17]	22q13.1	6-10% dintre caucazieni; 2-5% dintre afro-americani; 1% dintre asiatici	Debrisoquina; Sparteina; Nortriptilina; Codeina.	Efect accentuat; Efect accentuat; Efect accentuat; Efect redus.
CYP2C9[*2, *3]	10q24	6-8% dintre caucazieni	Warfarina; Fenitoina	Efect accentuat; Efect accentuat.
CYP2C19[*2, *3]	10q24.1-24.3	3-5% dintre caucazieni; 12-23% dintre asiatici	Omeprazol	Efect accentuat
Dihidropirimidin dehidrogenaza [D74V; C29R]	1p24	1% din întreaga populaţie	5-Fluorouracilul	Efect accentuat
Butirilcolinesteraza [D70G; T243M]	3q26.1-26.2	1 la 3500 europeni	Succinilcolina	Efect accentuat
Enzime de clasa II				
NAT2 [*58]	8p23.1-21.3	52% dintre caucazinei; 17% dintre japonezi	Izoniazida; Hidralazina; Procainamida.	Efect accentuat; Efect accentuat; Efect accentuat.
Uridin difosfat glucuronozil-transferaza 1A1 [P229Q, G309E]	2q37	11% dintre caucazieni; 1-4% dintre asiatici.	Irinotecanul; Bilirubina	Efect accentuat; Sindroamele Gilbert si Crigler-Najjar
Tiopurin 5-metiltransferaza [A80P, A154T]	6p22.3	1 la 300 caucazieni; 1 la 2500 asiatici.	Mercaptopurina; Azatioprina	Toxicitate; Toxicitate.
Catecol O-metiltransferaza [V158M]	22q11.2	25% dintre caucazieni	Levodopa	Efect accentuat

Circa 5-10% din persoane în populaţia caucaziană au o *deficienţă relativă* în abilitatea lor de a oxida două medicamente "test" pentru această categorie – *debrisoquina,* un medicament antihipertensiv, şi *sparteina*, un antiaritmic şi oxitocic – alcătuind un grup de subiecţi cu *metabolizare redusă ("slabă")*; ei au o eliminare urinară diminuată a metaboliţilor şi, consecutiv, o creştere a concentraţiei lor plasmatice, fapt ce produce efecte mai exagerate ale celor două medicamente-test, comparativ cu persoanele cu *metabolizare rapidă* (figura 8.4). Studiile genetice au arătat că oxidarea redusă a debrisoquinei şi sparteinei *se transmite ereditar*, autosomal recesiv, iar subiecţii sunt *homozigoţi* (sau heterozigoţi compuşi) pentru alele ce codifică enzime cu activitate CYP2D6 redusă sau nulă.

Având în vedere numărul mare de medicamente tranformate prin oxidare mediată de CYP2D6 s-au elaborat metode pentru determinarea statusului de *metabolizator redus sau metabolizator rapid (intens)* folosind ca "droguri test" debrisoquina sau sparteina. Din păcate aplicarea lor clinică de rutină s-a dovedit a fi dificilă. Atunci s-a recurs la tehnicile de genetică moleculară care au permis caracterizarea unor variaţii genetice (polimorfisme ADN) responsabile pentru activitatea redusă sau absentă a CYP2D6. Au fost descrise peste 75 de alele CYP2D6. Studiul subiecţilor cu *metabolizare rapidă* a arătat, surprinzător, că ei posedă mai multe copii ale genei CYP2D6. Aceasta explică răspunsul terapeutic inadecvat la dozele standard ale medicamentelor metabolizate de CYP2D6 (de exemplu, antidepresivul *nortriptilină*).

Studiul polimorfismelor genetice a fost extins şi la alte isoforme ale citocromului P-450, implicate în metabolizarea unor medicamente specifice (tabelul 8.3):

- CYP2C9 – care metabolizează warfarina, losartranul, fenitoina;
- CYP2C19 – care metabolizează omeprazolul;
- CYP3A5 – implicat în biotransformarea unui număr mare de medicamente.

Un alt exemplu de farmacogenetică a fazei I de transformare a medicamentelor îl reprezintă metabolismul *fluorouracilului,* un medicament antineoplazic, care în dozele standard poate produce o afectare fatală a SNC la persoanele cu deficienţă a dihidropirimidin dehidrogenazei.

b. Farmacogenetica fazei II de transformare a medicamentelor.

Unul din primele exemple descoperite de variaţii ereditare a enzimelor implicate în faza II-a de metabolizare a medicamentelor a fost *acetilarea izoniazidei* de către N-acetiltransferază (NAT). Astăzi se ştie că există două gene (localizate pe cromosomul 8) ce codifică acetiltransferaze – NAT1 şi NAT2 – şi că multe alte medicamente sunt metabolizate prin intervenţia lor (procainamida, hidralazina, nitrazepamul, dapsona, sulfametazina etc.).

Polimorfismul acetilării a fost identificat prima dată la bolnavii cu tuberculoză trataţi cu isoniazidă. Acetilatorii lenţi, homozigoţi pentru o alelă NAT2 deficientă, au o concentraţie plasmatică crescută a medicamentului, la o terapie standard, şi dezvoltă o neuropatie periferică, toxică. De asemenea acetilatorii lenţi expuşi la arilamine cancerigene (de exemplu, benzidina) au o incidenţă crescută a cancerului de vezică iar femeile la postmenopauză fumătoare au un risc crescut de cancer de sân. Acetilatorii rapizi au frecvent eşecuri ale terapiei cu isoniazidă administrată o dată pe săptămână. Dacă sunt hipertensivi necesită o doză mai mare de hidralazină pentru controlul tensiunii arteriale

Un alt exemplu îl reprezintă *metilarea tiopurinelor* (mercaptopurina şi azatioprina), antimetaboliţi folosiţi în clinică ca imunosupresoare şi pentru tratamentul unor neoplazii. Metilarea este produsă de către enzima *tiopurin S-metiltransferază* (TMTP). Pe baza nivelului de activitate a TMTP în hematii, populaţia poate fi divizată în trei grupe – cu metabolizare scăzută, medie, înaltă – iar nivelul individual se transmite *codominant*. La dozele standard de tiopurine persoanele cu activitate TMTP scăzută au o concentraţie crescută de metabolit activ şi un risc important de mielosupresie; la persoanele cu activitate TMTP înaltă eficacitatea tiopurinelor este redusă, deoarece drogul este metabolizat rapid. Astăzi există posibilitatea testării efectului farmacogenetic al TMTP şi individualizării terapiei pe această bază. Mai mult, gena TPMT a fost clonată iar variantele alelice responsabile de nivelul scăzut sau crescut al activităţii TPMT au fost identificate, putându-se astfel practica un diagnostic molecular precis.

2.2. POLIMORFISMELE GENETICE CU EFECTE INDIRECTE ASUPRA RĂSPUNSULUI LA MEDICAMENTE.

Polimorfismul unor gene ce codifică proteine care nu sunt implicate în biotransformarea medicamentelor şi nici în ţintele directe ale acţiunii lor – pot influenţa răspunsul la tratament:

- Diferenţe individuale în acţiunea *factorilor de coagulare* pot predispune femeile ce iau contraceptive orale la tromboze venoase (ale venelor profunde sau venelor cerebrale);
- Mutaţii ale genei *RYR1* ce codifică proteine ce formează un canal de eliminare a ionului de calciu din celulă produce *hipertermia malignă* (vezi caseta 8.2).
- Polimorfismul genelor pentru proteine de transfer ale *esterilor de colesterol* poate influenţa progresia aterosclerozei sub terapia cu statine;
- Variaţii genetice în *transportorii celulari de sodiu şi potasiu* (de exemplu, gena *KCNE2* ce codifică o subunitate a canalului de potasiu) pot avea un rol predispozant la efectele toxice (aritmii grave) ale unor droguri (trimetoprin-sulfametoxazol; claritromicină) ce induc la anumiţi pacienţi un sindrom QT-lung;

- Polimorfismul genei *apolipoproteinei E* (APOE) pare a influenţa răspunsul la terapia pentru boala Alzheimer precum şi la medicamentele ce scad lipidemia. Astfel pacienţii cu boală Alzheimer care au alela 4 a APOE (circa 40%) au răspuns redus la tratamentul cu inhibitori de acetilcolinesterază (tacrină); pacienţii cu alela 2 APOE au o diminuare mai importantă a LDL după terapia de scădere a lipidelor, inclusiv cu statine.

CASETA 8.2

Boli farmacogenetice frecvente

Sensibilitatea la succinilcolină.

Succinilcolina, folosită ca miorelaxant în intervenţiile chirurgicale, este formată din două molecule de acetilcolină şi necesită intervenţia unei colinesteraze serice pentru metabolizare (hidrolizeaza acetilcolinei). Funcţia normală a acestei enzime nu este încă bine definită dar ea nu poate avea un rol fiziologic major deoarece absenţa completă nu produce obişnuit boală.

Circa una din 3000 de persoane din populaţia europeană este homozigotă pentru o alelă mutantă, ce codifică o colinesterază atipică. Homozigoţii sunt incapabili de a degrada succinilcolina, ceea ce conduce la instalarea unei apnei prelungite (peste o oră), ce necesită ventilaţie artificială.

Gena implicată în sensibilitatea la succinilcolină este gena pentru butirilcolinesterază (BCHE) localizată pe cromosomul 3q21-26. În populaţie există două variante genice cu acţiune codominantă: “U” (usual) şi A (atipică). Alela A a rezultat prin mutaţia cu sens greşit (Asp70Gly) şi determină o sensibilitate exagerată la acţiunea succinilcolinei.

Hipertermia malignă.

Este o afecţiune monogenică cu *transmitere dominant-autosomală.* Boala apare după administrarea unor anestezice inhalatorii, de tipul halotanului, sau a unor miorelaxante, de tipul succinilcolinei. Maladia se caracterizează prin hipertermie, spasme musculare şi, în final, exitus.

Incidenţa bolii la copii este estimată la 1:12000, iar la adulţi la 1:100.000.

În majoritatea cazurilor, este implicată gena RYR1, localizată pe cromosomul 19q13.1-13.2, care codifică un canal ionic de calciu. În alte cazuri, au fost identificate mutaţii ale genei CACNL1A3, care codifică subunitatea α_1 a receptorului dihidropiridinei.

Porfiria acută intermitentă.

Este o boală cu transmitere autosomal dominantă ale cărei manifestări clinice sunt declanşate de diferite medicamente (barbiturice, sulfamide etc), unii hormoni steroizi sau înfometare. Tabloul clinic este polimorf şi poate mima variate stări patologice, de la abdomen acut la psihoze. Defectul primar este reprezentat de către deficienţa în porfobilinogen (PBG) dezaminază, care transformă PBG într-un precursor al hemului. Administrarea unor compuşi chimici creşte sinteza de citocrom P450 hepatic (proteină ce conţine hem) şi prin aceasta scade nivelul celular al hemului care, prin mecanism feed-back, va declanşa sinteza de PBG; acesta nu va putea fi însă metabolizat, determinând disfuncţiile neurologice.

Deficienta in glucozo-6-fosfat dehidrogenaza

Este o afecţiune recesivă legată de X şi este considerată a fi cea mai frecventă boală enzimatică cu circa 400 milioane indivizi afactaţi în întraga lume. Boala se manifestă prin apariţia la bărbaţi a unor crize de hemoliză induse de o serie de medicamente oxidante ca antimalaricul primachina, antibioticele sulfonamidice, sulfonele precum dapsona utilizată în tratamentul leprei, naftalenul sau ingestia de *Vicia faba*. Toţi aceşti agenţi acţionează prin depleţia NADPH care protejează eritrocitele împotriva alterarilor oxidative prin regenerarea glutationului redus.

2.3 FARMACOGENOMICA ŞI VARIABILITATEA FARMACODINAMICĂ

În afara variaţiilor genetice ale metabolismului medicamentelor, descrise anterior, aria farmacogeneticii s-a extins şi la alte etape ale farmacocineticii şi farmacodinamicii drogurilor. Au fost studiate în mod deosebit proteinele implicate în *transportul* medicamentelor în

organism iar, mai recent interacţiunea medicamentelor cu *ţintele terapeutice* (receptori, enzime etc). Cert este că multe medicamente sunt transportate şi metabolizate prin intervenţia unor proteine-enzime multiple, care acţionează în etape şi pe căi multiple – astfel că variaţiile genetice au un *determinism poligenic*, cu o distribuţie suprapusă, de aspect gaussian. În aceste condiţii numai studiile bazate pe *polimorfismul ADN* (SNPs[8], microsateţiţii, minisateliţii, inserţiile şi deleţiile mici etc) (vezi capitolul 6.D.2) ar putea permite obţinerea unor informaţii farmacogenetice despre numeroasele gene ce codifică proteine relevante în biotransformarea şi acţiunea unor medicamente. Se trece astfel de la farmacogenetică la **farmacogenomică.** Termenii sunt relativ sinonimi ca sens şi numai din raţiuni practice şi ...didactice deosebim *farmacogenetica* – care foloseşte metodele clasice ale geneticii (bazate pe relaţia fenotip-genotip) concentrându-şi preocupările pe *metabolismul* medicamentelor – de *farmacogenomică*, care foloseşte studiul polimorfismelor ADN din genomul uman (relaţia genotip-fenotip) pentru analiza variaţiilor în *transportul* medicamentelor şi *ţintele lor de acţiune*(receptori, enzime etc). Au fost deja identificate peste 60.000 de SNPs în regiunile *codante* ale genelor şi unele dintre acestea au fost deja asociate cu modificări substanţiale în metabolismul sau efectele medicamentelor.

a. Polimorfismul proteinelor de transport

Proteinele de transport au un rol important în absorbţia, distribuţia şi excreţia multor medicamente. Cel mai intens studiate sunt proteinele din familia transportorilor membranari-fixatori de ATP (numiţi şi transportori ABC) şi în special **glicoproteina-P**, codificată de gena *ABCB1* (numită şi MDR1 – de la *Multiple Drug Resistance*); funcţia principală este *efluxul celular* de substrate (şi deci de numeroase medicamente) sau, mai clar, excreţia de xenobiotice şi metaboliţi în urină, bilă, lumen intestinal; ea acţionează şi la nivelul barierei creier-sânge din plexurile coroide, limitând acumularea multor droguri în creier. În structura genei *ABCB1* au fost identificate două *polimorfisme SNP*s, în codonul 21 şi 26, care s-au dovedit a fi asociate cu variaţii în disponibilitatea drogurilor, concentraţiile plasmatice sau efectul lor (spre exemplu, în tratamentul epilepsiei sau în terapia antitumorală. În afara de glicoproteina-P, au fost studiate polimorfismele altor transportori ABC şi influenţa lor asupra acţiunii unor medicamente (de exemplu, unele variante alelice ale genei ABCC4 dau rezistenţă la tratamentul cu agenţi antiretrovirali în HIV).

b. Polimorfismul genetic ce influenţează ţintele medicamentelor.

Variaţiile genetice în ţintele de acţiune ale medicamentelor (de exemplu, receptorii) pot avea un efect important asupra eficacităţii lor. Dintre multiplele exemple studiate recent vom menţiona polimorfismul genei ADRB2 pentru **adrenoreceptorul-2**, "ţinta" celor mai frecvent utilizate medicamente în astm dar şi în alte afecţiuni. Diferite variante (SNPs) ale genei influenţează funcţia receptorului (procesul de transducţie a semnalului) şi răspunsul farmacologic la o serie de medicamente: agonişti-2 (folosiţi pentru vasodilataţie sau bronhodilataţie, în astm), inhibitori ai enzimei de conversie ai angiotensinei (ACE) sau inhibitori de arahidonat-5-lipooxigenază (ALOX5).

În cazul cancerului mamar, administrarea de herceptin, un anticorp monoclonal hibrid cu fixare specifică pe *receptorul HER2*, are eficienţă crescută la pacientele cu hiperexpresie a acestui receptor; la ora actuală există un test specific – HERCEPTEST - de detecţie a activităţii receptorului, ceea ce permite alegerea pacientelor la care acest tratament este benefic.

c. Perspectivele farmacogenomicii

Una din marile probleme ale medicinii moderne este aceea a îmbunătăţirii efectului medicamentelor. Există, însă, dificultăţi serioase în evaluarea componentei ereditare a răspunsului la medicamente:

- cunoştinţe incomplete despre farmacocinetica şi mecanismul de acţiune a unor medicamente;

[8] SNPs – de la *Single Nucleotid Polimorphism*; se citeşte *snaips.*

- răspunsul organismului la droguri are un determinism poligenic, fapt ce necesită identificarea multiplelor gene implicate şi stabilirea relaţiei dintre efecte medicamentelor şi anumite polimorfisme ADN ale acestor gene;
- realizarea dificilă a studiilor familiale; necesitatea unui mare număr de pacienţi expuşi la drog şi urmăriţi *á la longue*;
- relaţiile farmacogenetice trebuie să fie validate pentru fiecare indicaţie terapeutică şi în diferite grupuri etnice, din cauza heterogenităţii populaţiilor (un anumit genotip poate fi important în determinarea efectelor unui medicament într-o anumită populaţie dar nu şi în altele);
- existenţa unor dileme bioetice legate de furnizarea de date prognostice şi alegerea terapiei.

Dezvoltarea geneticii moleculare şi amplificarea cunoştinţelor despre genomul uman şi acţiunea genelor va avea un impact major asupra producerii medicamentelor şi administrării lor, într-un mod care este greu de imaginat astăzi. În mod cert ele vor duce la identificarea unor noi medicamente precum şi la ameliorarea eficacităţii şi siguranţei medicamentelor, în toate specialităţile medicale (vezi caseta 8.3).

CASETA 8.3

Aplicaţiile farmacogeneticii în domeniul cardiologiei.

- Pacienţii cu *insuficienţă cardiacă congestivă*, purtători ai mutaţiei genei enzimei de conversie a angiotensinei (ACE) ce determină formarea unei variante trunchiate a enzimei ar putea beneficia de tratament cu betablocante; acest lucru este posibil deoarece la homozigoţii mutanţi nivelul activităţii ACE este foarte înalt, cordul este suprasolicitat, deteriorându-se rapid; la aceşti pacienţi, tratamentul betablocant având acţiune deprimantă asupra axului renină-angiotensină-aldosteron (RAA) are efecte benefice asupra funcţiei cardiace.
- Ţinând cont de aceste aspecte, efectul inhibitorilor ACE în HTA variază în funcţie de profilul genetic, fiind astfel utilă determinarea acestui profil, bazat pe identificarea SNPs.
- În plus, efectul medicaţiei antihipertensive depinde şi de rata de metabolizare a aldosteronului, a cărui sinteză depinde de acţiunea mai multor enzime CYP polimorfe (11-β-hidroxilaza şi aldosteron-sintetaza); gradul de remodelare cardiacă (hipertrofia) şi vasculară (rigidizarea) în caz de HTA este influenţat de cantitatea şi de tipul celor două enzime din ţesutul miocardic şi vascular, de unde şi variabilitatea răspunsului la antialdosteronice.
- Răspunsul la inhibitorii de HMG-reductază în tratamentul hipercolestoremiei ar depinde de polimorfismul CETP (colesteryl-ester-transfer-protein). Purtătorii de alele B1B1 prezintă niveluri crescute cu CETP şi concentraţii crescute de LDL, dar răspund mai bine la tratamentul cu statine (comparativ cu purtătorii de alele B2B2 care pot fi clasaţi drept non-responderi).

Domeniile cercetării farmacogenomice sunt reprezentate de:
- identificarea genelor cauzatoare de boală, ce pot fi manipulate prin medicamente;
- identificarea polimorfismelor genetice implicate în metabolizarea medicamentelor (la cele 3 nivele: enzime de biotransformare şi conjugare, proteine de transport, receptori);
- stratificarea medicamentelor în funcţie de polimorfismul mononucleotidic, adică individualizarea terapiei medicamentoase în funcţie de profilul genetic individual pentru a evita reacţiile adverse;
- stratificarea genetică populaţională prin scanarea genomului uman pentru identificarea genelor implicate în răspunsul la tratament;
- determinarea tipurilor de expresie genică (proteom) în ţesuturile ţintă precum şi a interacţiunii dintre medicament şi receptorul-ţintă prin analiza programului transcripţional al ţesutului ţintă privind răspunsul la medicament.

Nu înseamnă totuşi că farmacogenetica va revoluţiona medicina... peste noapte, deoarece translaţia rezultatelor din cercetare în medicina clinică este dificilă, de durată şi

scumpă. Costurile actuale pentru asemenea „screeninguri farmacogenomice" sunt mari dar cu siguranţă tehnologia microcipurilor ("*microarray*")[9] se va dezvolta iar beneficiile reducerii frecvenţei raspunsurilor adverse şi ale creşterii eficenţei terapeutice vor justifica investiţiile. „Medicina predictivă şi individualizată", personalizată în funcţie de genotipul individului afectat şi tratat, este realmente posibilă dar...într-un viitor apropiat.

În concluzie, farmacogenomica reprezintă un nou domeniu de aplicare al farmacogeneticii, cu implicaţii majore în sinteza ţintită a anumitor medicamente şi cunoaşterea profilului răspunsului individului la acţiunea noilor medicamente. Aceste implicaţii pot avea două beneficii majore: predicţia, cu un grad înalt de acurateţe, a indivizilor ce pot avea reacţii adverse la un medicament (prin cartografierea SNPs a genomului) şi dezvoltarea profilurilor farmacogenetice, ce va permite ajustarea dozei medicamentoase pentru realizarea unei eficienţe maxime.

C. BOLILE GENETICE

Recunoaşterea rolului factorilor genetici în cauzalitatea bolilor umane a determinat clasificarea lor în trei mari categorii: boli ecologice – negenetice (produse de factorii din mediul extern), boli multifactoriale (produse de acţiunea combinată a factorilor de mediu şi a factorilor genetici) şi boli genetice (determinate predominant de mutaţii). În secţiunile precedente ale acestui capitol am argumentat faptul că, în afară de traumatisme, termenul de "negenetic" poate fi impropriu căci este greu de conceput că o boală poate fi integral negenetică. Factorii genetici sunt prezenţi de la concepţie iar dezvoltarea unui individ depinde de interacţiunea factorilor genetici şi de mediu. De aceea, orice variaţie umană, atât în starea de sănătate cât şi de boală, implică acţiunea într-o anumită proporţie a factorilor genetici. Astfel, chiar în bolile bine definite ecologic (de exemplu, infecţiile) factorii genetici pot juca un rol critic. Se poate deci afirma că aproape *toate bolile umane au o componentă genetică*, mai mare sau mai mică. În aceste condiţii se pune firesc întrebarea: ce sunt de fapt bolile genetice?

Termenul de **boli genetice** este rezervat cu precădere afecţiunilor *determinate* de mutaţii genice şi anomalii cromosomice dar genetica medicală include în sfera sa de acţiune şi bolile multifactoriale, *condiţionate* genetic sau cu predispoziţie genetică, mai ales acelea în care factorii genetici au o contribuţie (exprimată prin *heritabilitate*) mai mare de 50% (majoritatea malformaţiilor izolate, bolile comune ale adultului şi numeroase forme de cancer). Indiferent de terminologie şi încadrare, se poate afirma justificat că *mutaţiile reprezintă o cauză majoră de boală sau predispoziţie la boală*. Genetica umană a dobândit, într-un timp relativ scurt, un rol din ce în ce mai important în practica medicinii clinice, fiind o componentă centrală a înţelegerii celor mai multe boli majore (de la bolile copilăriei până la bolile comune ale adultului), a diagnosticului şi profilaxiei lor.

1. CLASIFICAREA BOLILOR GENETICE

În funcţie de tipul de modificări genetice, de localizarea şi acţiunea lor – se pot deosebi cinci categorii de boli genetice: boli cromosomice, boli monogenice (mendeliene sau moleculare), boli mitocondriale, boli multifactoriale şi boli ale genomului celulelor somatice.

Aceasta este o clasificare "practică" dar de etapă, deoarece, aşa cum vom vedea, diferenţele dintre aceste categorii tind să se estompeze iar identificarea unor mecanisme genetice noi va duce, probabil, la noi clasificări. In acest sens vom reaminti (vezi capitolul 6.B.1.3) grupul de *boli genomice* produse prin recombinarea omologă nealelică între diferite regiuni din genom, determinată de „arhitectura" lui specifică; în funcţie de mărimea segmentului genomic implicat se poate produce: o boală monogenică, un sindrom al genelor contigue sau o aberaţie cromosomică (vezi tabelul 6.1).

[9] Într-o singură probă obişnuită de sânge se va putea evaluapolimorfismul a 20.000 SNPs din 5000 de gene pentru determinanţii principali ce influenţează distribuţia şi efectele medicamentelor.

a. Bolile cromosomice.

Bolile cromosomice sunt produse de modificări în numărul şi structura cromosomilor, „vizibile la microscop" (inclusiv prin tehnicile de FISH; vezi capitolul 2.D.3.2). Această ultimă precizare exclude deleţiile/duplicaţiile genice identificate numai prin tehnicile de analiză moleculară. Oricum, sindroamele produse de microdeleţii sau microduplicaţii de circa 4Mb se găsesc la limita dintre bolile cromosomice şi bolile moleculare.

Frecvenţa anomaliilor cromosomice, estimată (cu tehnicile clasice) prin studii sistematice la nou-născuţi vii, este în jur de 6‰. Această valoare este, evident, o subestimăre a frecvenţei reale şi, pe baza datelor obţinute cu tehnicile de marcaj în benzi şi FISH, se apreciază că frecvenţa reală este de circa 9-10‰ nou-născuţi vii (vezi capitolul 6.C.3); anomaliile neechilibrate vor produce sindroame plurimalformative (peste 600 de entităţi în catalogul editat de Schinzel, 1984) iar cele echilibrate, deşi nu modifică fenotipul pacientului, pot genera tulburări de reproducere. Aceste cifre reprezintă doar „partea vizibilă" a icebergului deoarece aşa cum am arătat deja (vezi tabelul 6.6) mulţi embrioni cu anomalii cromosomice se elimină precoce în viaţa intrauterină.

Oricum, aberaţiile cromosomice sunt principalele cauze ale anomaliilor congenitale multiple, retardului mintal, tulburărilor pubertare sau de reproducere (sterilitate, avorturi spontane, nou-născuţi morţi). Cele mai frecvente boli cromosomice vor fi descrise în capitolul 10.

b. Bolile monogenice.

Bolile monogenice sunt produse de *mutaţia unei singure gene* (din genomul nuclear) *cu efect major*, care codifică o proteină de structură sau o enzimă. Aceste mutaţii se *transmit* în succesiunea generaţiilor după tipul mendelian: autosomal dominant, autosomal recesiv sau legat de X; de aceea mai sunt numite boli mendeliene şi sunt repertoriate în catalogul *Mendelian Inheritance of Man,* editat (din 1966) de Victor McKusick (ed.12, 1998; *OMIM* - versiunea online) (vezi caseta 5.4). Din cele peste 14.000 de caractere mendeliene, normale sau patologice, listate în OMIM aproape 9.000 reprezintă boli monogenice care realizează o frecvenţă globală estimată iniţial la 10‰ nou-născuţi (Carter,1977); incidenţa reală, actuală, este foarte probabil dublă (20-24‰) dar există motive să apreciem că aceasta va creşte o dată cu identificarea unor noi mutaţii genice. În circa 40% din bolile monogenice a fost localizată (deseori clonată) gena implicată şi se cunoaşte defectul primar, proteina anormală; pentru aceste afecţiuni se foloseşte deseori, în practică, termenul de *boli moleculare*. Bolile monogenice, mendeliene, mai frecvente vor fi prezentate în capitolul 11.

c. Bolile mitocondriale

Bolile mitocondriale sunt un tip particular de boli monogenice produse de mutaţii în *genomul mitocondrial*, care afectează producerea de energie în muşchi şi nervi; ele au un rol important în îmbătrânirea celulară. Se cunosc până în prezent 60 de boli mitocondriale, în majoritatea lor rare, dar probabil că mutaţiile genomului mitocondrial sunt implicate într-un mod mult mai complex în patologia umană (vezi capitolul 12).

d. Bolile multifactoriale

Bolile multifactoriale pot avea o *distribuţie familială* dar NU se transmit mendelian (!). Această caracteristică demonstrează intervenţia unor factori ereditari (reprezentaţi de obicei prin mai multe gene – poligenie) care interacţionează permanent şi complex factorii de mediu, pentru a produce starea de boală. De cele mai multe ori, factorii genetici realizează o *predispoziţie genetică*, o vulnerabilitate individuală la îmbolnăvire. Bineînţeles, nu toţi indivizii predispuşi se îmbolnăvesc deoarece vulnerabilitatea se distribuie în populaţie sub forma curbei Gauss şi este necesară intervenţia factorilor de mediu care, atunci când depăşesc un anumit prag, transformă predispoziţia în boală (vezi capitolul 6.E.2 – modelul distribuţiei continue cu prag).

Progrese recente în studiul unor boli multifactoriale pledează pentru existenţa unui model alternativ, mixt, în care factorii genetici sunt reprezentaţi de o componentă monogenică majoră (una sau două gene importante în patogenia bolii, cu mai multe alele cu

acţiune/eficienţă variabilă) şi o componentă poligenică minoră care interacţionează cu factori de mediu şi împreună modulează efectul genei/genelor majore.

Teoria oligogenică ar reprezenta de fapt o piesă a spectrului complex al determinismului bolilor umane, ilustrat în figura 8.5, care face tranziţia dintre bolile monogenice şi cele poligenice. Această teorie deschide o perspectivă optimistă pentru identificarea genelor de predispoziţie, depistarea indivizilor predispuşi genetic şi descoperirea agenţilor de mediu decisivi pentru o boală. Paradoxal, unul din cele mai importante beneficii ale identificării genelor de susceptibilitate la boală nu este potenţial util pentru terapia genică ci mai curind pentru oportunităţi de tratament şi prevenţie a bolilor prin intermediul manipulării mediului în care anumiţi indivizi dezvoltă un risc genetic (vezi capitolul 6.E.3).

Vom încheia această prezentare subliniind că bolile multifactoriale (vezi capitolul 13) nu sunt numai complexe ci şi relativ frecvente: malformaţiile congenitale şi bolile psihice la copil au o incidenţă de 20-30‰ iar bolile comune ale adultului au o frecvenţă de două ori mai mare; per total, incidenţa bolilor multifactoriale depăşeşte 50 ‰.

e) Bolile prin mutaţii somatice

Bolile prin mutaţii somatice rezultă prin efectul cumulativ al unor *mutaţii somatice succesive, în gene diferite*, unele produse prin erori de replicare a ADN, iar altele de către factori de mediu. În această categorie se includ marea majoritate a cancerelor, multe boli autoimune, precum şi procesul de îmbătrânire; bolile se produc *după concepţie*, sunt *limitate la celulele somatice* şi deci *NU se transmit la descendenţi*. Într-un procent mic de cazuri o mutaţie iniţială (importantă dar nu suficientă pentru producerea bolii) se poate moşteni de la unul din părinţi, producând o predispoziţie genetică la boală (de exemplu, mutaţia genei BRCA1 în cancerul de sân familial). Frecvenţa acestei categorii de boli este estimată la circa un sfert din populaţia adultă (vezi tabelul 1.2).

2. CARACTERELE GENERALE ALE BOLILOR GENETICE.

Bolile genetice prezintă o serie de caracteristici generale determinate de natura lor, care permit deseori medicului practician să-şi orienteze diagnosticul clinic şi etiologic.

Indiferent de tipul de boli genetice şi deci de încadrarea în una din cele cinci categorii precizate mai sus, în determinismul lor intervin – în proporţii variabile – factori genetici, mutaţii patogene sau neutre (generatoare de polimorfisme genetice), în celulele germinale sau somatice. Ele pot fi identificate direct prin analiza cromosomilor sau a ADN genomic şi/sau indirect prin efectele primare (la nivelul proteinelor) sau secundare (la nivel celular) (vezi "modelul" sicklemiei, prezentat în capitolul 4.B.3) şi, uneori, prin caracterul familial/ereditar al bolii.

Bolile genetice sunt determinate prenatal, prezente la naştere dar manifeste clinic neonatal sau mai târziu în alte perioade de viaţă, inclusiv la adult (de exemplu, hemocromatoza, hipercolesterolemia familială sau ADPKD – ca să nu citǎm decât unele boli frecvente – se manifestă fenotipic după 30-40 de ani). Acest *caracter congenital* (lat. *congenitus* = *născut cu*) este un indicator preţios pentru natura genetică a unui caracter. Dar sensul corect, subliniem încă o dată, este de *existent* la naştere, cu origine anterioară acestui moment, adică în viaţa intrauterină. De asemenea este important să ştim şi să nu greşim punând semnul egalităţii între congenital şi genetic, deoarece există anomalii congenitale negenetice, produse de agresiuni embrio-fetale exercitate de unii agenţi externi ca, de exemplu, virusul rubeolei, alcoolismul matern sau unele medicamente (celebrul caz al talidomidei) (vezi capitolul 14). Vom mai menţiona faptul că bolile prin mutaţii somatice (de exemplu, neoplaziile) nu au, deobicei, un caracter congenital (excepţie fac desigur cancerele ereditare sau familiale).

Bolile genetice sunt deseori *familiale* regăsindu-se şi la alţi membri ai familiei bolnavilor. Desigur, aceasta nu este o regulă absolută deoarece există destule boli genetice *sporadice*, în care bolnavul (ce a suferit o *mutaţie* nouă) este singurul membru afectat al

familiei, sau boli negenetice prezente la mai multe persoane din familie care au acelaşi mediu de viaţă (de exemplu, unele infecţii cronice ca tuberculoza sau hipotiroidia prin carenţă de iod în alimentaţie or alcoolismul).

O parte din bolile genetice sunt *ereditare,* în sensul transmiterii lor în succesiunea generaţiilor, frecvent după un model mendelian. Termenul de boală genetică, produsă prin mutaţii, este mai general şi nu se suprapune obligatoriu cu cel de boală ereditară, care presupune evident prezenţa afecţiunii la bolnavi din generaţii diferite. Multe boli cromosomice şi monogenice sunt genetice dar modificările fenotipice consecutive mutaţiilor sunt fie sunt letale înainte de perioada de reproducere, fie determină o incapacitate de procreare (organică sau situaţională). De asemena, circa 2/3 din cancere se produc prin acumularea de mutaţii succesive în unele celule somatice (ce formează o clonă anormală) care însă nu se transmit la descendenţi. De subliniat necesitatea evitării erorii de a considera ereditare unele boli exogene, pentru că sunt prezente la bolnavi din generaţii diferite; nu se poate vorbi de tuberculoză ereditară (deşi aşa cum am menţionat există o predipoziţie genetică; vezi caseta 8.1) şi nici de sifilis ereditar (pentru că *Treponema pallidum* nu afectează genomul ci ci doar se transmite trans-placentar de la mamă la făt).

În literatura de specialitate, bolile determinate sau condiţionate genetic au mai fost caracterizate prin concordanţa lor mult mai mare la gemenii monozigoţi, comparativ cu gemenii dizigoţi (vezi capitolul 5.E) sau prin distribuţia lor în anumite grupuri etnice sau populaţionale (vezi capitolul 7.B.4). Aceste caracteristici au firesc mai puţină utilitate practică.

În încheierea acestei prezentări a caracterelor generale ale bolilor genetice, utile pentru a preciza natura lor, vom spune că nu este întotdeauna uşor de răspuns cu "DA" sau "NU" la întrebarea: "boala pacientului este determinată genetic?". Este drept că în cadrul discuţiei despre etiologia bolilor, am afirmat că orice afecţiune care nu este cert şi evident cauzată de factori externi poate fi considerată genetică dar aceasta este doar o generalizare care nu permite încadrarea în boli determinate genetic (bolile cromosomice, bolile monogenice şi mitocondriale) sau boli condiţionate genetic (bolile multifactoriale). Analiza, uneori dificilă, a criteriilor menţionate mai sus va permite o clasificare adecvată, în funcţie de natura mutaţiilor (detalii în capitolul 9). Cert este că acurateţea diagnosticului, anamneza familială, posibilităţile de explorare genetică şi, nu în ultimul rând, experienţa medicului sunt decisive. Iar acţiunea aceasta nu este numai "un joc al inteligenţei" ci un fapt necesar pentru buna îngrijire şi consiliere medicală a bolnavului şi familiei sale, o latură obligatorie a relaţiei actuale dintre medic şi pacient.

3. IMPACTUL ŞI CONSECINŢELE BOLILOR GENETICE ASUPRA STĂRII DE SĂNĂTATE

Impactul şi consecinţele bolilor genetice (cromosomice, monogenice şi multifactoriale, cu predispoziţie genetică) asupra stării de sănătate este important şi deosebit de actual; el poate fi uşor demonstrat prin statisticile internaţionale şi modul în care este abordată această patologie în numeroase ţări.

Bolile genetice sunt numeroase. Se cunosc peste 10.000 de boli determinate sau condiţionate genetic; o parte semnificativă din aceste afecţiuni sunt mai frecvente (1:500 – 1:10.000 nn), altele sunt însă mult mai rare; ele au o mare diversitate şi *se regăsesc în aproape toate specialităţile medicale*. Deci, orice medic, de la medicii de familie la specialişti, vor fi confruntaţi în activitatea lor cu diferite probleme de patologie genetică.

Bolile genetice sunt, în ansamblul lor, *frecvente*; ele afectează *5-8% din nou-născuţi* deci 1 din 20 de indivizi până la 25 de ani şi probabil 30-40% în tot cursul vieţii (vezi, în capitolul 1, tabelul 1.2). În fiecare an se nasc în România circa 7.500 copii cu anomalii congenitale, boli monogenice sau cromosomice şi alţi 10.500 vor face o afecţiune multifactorială înainte de 25 de ani. Deci peste 18.000 de copii şi familiile lor (cu risc de

recurenţă) au nevoie anual de diagnostic, explorări şi sfat genetic. La aceasta se adaugă rolul important al factorilor genetici în determinismul tulburărilor de reproducere (sterilitate şi avorturi spontane).

Bolile genetice au o contribuţie majoră la creşterea *morbidităţii şi mortalităţii,* mai ales la copii.

- Acum mai puţin de un secol bolile produse de cauze negenetice (malnutriţie, infecţii, condiţii insalubre etc) produceau majoritatea deceselor la copil; în secolul XX sănătatea publică s-a îmbunătăţit şi, ca rezultat, *mortalitatea infantilă* s-a redus iar bolile genetice au devenit responsabile de cele mai multe decese la copil. De exemplu, în Marea Britanie mortalitatea infantilă era în 1914 de 154 la 1000 de nou-născuţi iar bolile genetice şi malformative produceau 16,5% din decese; până în anul 1991 mortalitatea infantilă a scăzut spectaculos la 7,4 la 1000 de nou-născuţi iar "contribuţia" patologiei genetice a ajuns la aproape 50%.
- Îmbolnăvirile prin afecţiuni genetice sau anomalii congenitale determină 30-50% din *internările în spitalele* de copii şi circa 10% din internările în spitalele de adulţi. Mai mult, pacienţii cu boli genetice sunt spitalizaţi mai frecvent şi pe perioade mai lungi.
- Bolile genetice sunt *boli cronice* care realizează frecvent un handicap fizic / senzorial / motor sau mintal (circa 75% din toate handicapurile severe ale copilăriei sunt de natură genetică). Natura cronică a multor boli genetice implică o grea *povară medicală, financiară şi emotională* pentru pacienţii afectaţi şi familiilor lor ca şi pentru societate în general.

Se poate conchide fără rezerve că *bolile genetice reprezintă o problemă majoră de sănătate* publică, ce impune MSF acţiuni concrete şi eficace de diagnostic şi profilaxie la nivel naţional. Genetica medicală a devenit o specialitate clinică distinctă care se ocupă de diagnosticul şi îngrijirea pacienţilor cu boli genetice precum şi de familiile lor, prin: sfat genetic, diagnostic prenatal, screening neonatal sau diagnostic presimptomatic. În felul acesta genetica este implicată în asigurarea *"sănătăţii de-a lungul generaţiilor".* Ponderea serviciilor de genetică medicală în asistenţa medicală a populaţiei a devenit importantă şi nu mai poate fi ignorată. *"Copiii handicapaţi sunt victime ale destinului şi este păcat să fie şi victime ale indiferenţei sau ignoranţei noastre"(J.F.Kenedy).*

În aceste condiţii, precum şi datorită contribuţiilor noi, majore şi eficace în prevenirea bolilor, serviciile de genetică medicală trebuie sa devină o parte integrantă a strategiei sanitare a fiecărei ţări. Dacă ne referim la strategie, să nu uităm că numeroasele descoperiri din ultimele decenii au avut efecte importante asupra *teoriei şi practicii medicale.* Medicina a devenit moleculară, s-a introdus diagnosticul genotipic au apărut farmacologia genomică şi terapia genică şi s-au pus bazele profilaxiei personalizate şi medicinii predictive (vezi capitolul 1.D). Toate acestea vor reduce semnificativ "povara genetică".

D. ABORDAREA GENETICĂ ÎN MEDICINĂ

Practica medicală se bazează în esenţă pe *îngrijirea* unor pacienţi care au o anumită *suferinţă*. Medicul implicat în această acţiune trebuie să obţină date pentru a răspunde la două întrebări specifice, esenţiale:

(1) *ce are pacientul?*

(2) *ce se poate face pentru pacient?*

Aceste întrebări exprimă în principiu elementele majore, clasice, ale *relaţiei medic – bolnav*: diagnosticul şi tratamentul bolii, care – aşa cum am arătat mai sus – constituie reperele concepţiei esenţialiste despre boală.

Dezvoltarea remarcabilă a *geneticii medicale* în ultimii 30 de ani, atât în planul informaţiilor cât şi al posibilităţilor practice de evaluare a pacienţilor, a adăugat alte două întrebări care, evident, lărgesc sfera problemelor şi raporturilor dintre medic şi pacient:

(3) *de ce <u>acest</u> pacient a făcut <u>această</u> boală, <u>acum</u>?*

(4) *ce posibilităţi există pentru a preveni sau reduce în viitor manifestarea bolii – la pacient şi/sau familia sa?*

Prin a treia întrebare se urmăreşte stabilirea *etiopatogeniei afecţiunii.* Genetica umană a demonstrat că *fiecare om este unic* pentru că are o anumită structură genetică şi biologică care explică diferenţele individuale în capacitatea de apărare sau metabolizare a substanţelor şi, deci, în vulnerabilitatea organismului la agresiunile mediului. Deasemeni, a devenit evident că aproape *orice boală este rezultatul interacţiunii factorilor genetici cu factorii de mediu*.

Ultima întrebare vizează *prognosticul şi profilaxia* complicaţiilor bolii la pacient precum şi *riscul de apariţie a afecţiunii la alţi membri ai familiei*. Posibilitatea transmiterii genelor mutante sau a genelor de susceptabilitate la rudele bolnavului determină implicarea medicului în viaţa familiei, pentru a evita apariţia sau recurenţa bolii la alte persoane.

A devenit evident că în relaţia sa cu bolnavul medicul trebuie să ţină cont de toate aceste elemente noi, fundamentate de genetică. În felul acesta relaţia medic-pacient devine mai complexă, căpătând o nouă dimensiune reprezentată de **abordarea genetică** (figura 8.6). Ea a devenit o componentă de rutină a îngrijirii bolnavilor şi a prevenirii îmbolnăvirilor.

Abordarea genetică se bazează pe trei principii majore, ce determină acţiuni distincte:

- pacientul are o anumită individualitate biologică,
- în marea majoritate a bolilor intervin factori genetici, determinanţi sau favorizanţi,
- genele mutante se transmit la alte persoane din familie.

(2) Individualitatea biologică

Individualitatea biologică a fiecărei persoane este determinată de structura genetică unică, matricea dezvoltării sale (sex, vârstă, gândire, comportament), mediul în care s-a dezvoltat şi experienţa sa de viaţă (educaţie, ocupaţie, status socio-economic, obiceiuri, alimentaţie etc) (vezi capitolul 1.B.1). Această *unicitate bio-psiho-socială* poate explica:

- *răspunsul specific la agresiunile* factorilor de mediu sau *predispoziţia genetică* la anumite boli comune; aşa cum vom vedea în secţiunea următoare (ecogenetica), în funcţie de structura şi eficienţa sistemelor ce intervin în menţinerea homeostaziei, fiecare om este mai rezistent sau mai vulnerabil la anumite agresiuni ale factorilor biologici, chimici sau fizici din mediu; cu alte cuvinte *„suntem inegali în faţa bolii”*;
- *manifestările variabile şi gravitatea bolii*, au fost recunoscute de mult timp şi sintetizate în celebrul aforism *„nu există boli ci numai bolnavi”*; explicaţiile acestor fenomene au fost denumite „constituţie” sau „teren” dar în final reprezintă consecinţele individualităţii biologice, determinată în primul rând de gene şi apoi de mediu;
- *răspunsul particular la tratament* al fiecărui bolnav, determinat de capacitatea de metabolizare şi eliminare a compuşilor chimici (vezi secţiunea de farmacogenetică); la bolnavi cu aceeaşi afecţiune un medicament administrat în aceeaşi doză poate avea efecte diferite: la unii va fi terapeutic, la alţii nu va produce vindecarea iar la unele persoane va da reacţii adverse; tratamentele şi dozele medicamentelor vor fi adaptate la fiecare bolnav.

(2)Natura genetică a bolii.

In funcţie de ponderea factorilor etiologici – genetici şi de mediu – bolile umane sunt *determinate genetic* (produse predominant de mutaţii), *condiţionate genetic* (multifactoriale) şi *negenetice*. Cele mai numeroase afecţiuni, mai ales în medicina adultului, sunt bolile multifactoriale, în care factorii genetici determină o *predispoziţie genetică* la boală; persoanele vulnerabile se îmbolnăvesc numai în anumite condiţii de mediu.

“*Toţi clinicienii* trebuie să fie capabili *să determine* dacă o anumită boală este genetică, parţial (posibil) genetică sau negenetică…Ei trebuie *să înţeleagă* natura bolii şi consecinţele sale şi să fie capabili *să discute* aceste informaţii cu bolnavul şi familia lui şi *să-i îndrume*, dacă este necesar, la alţi specialişti...” (Riccardi).

Stabilirea naturii genetice a unei boli nu este o acţiune simplă (vezi capitolul 9); ca şi în alte domenii ale medicinii, aceasta poate implica mai mulţi specialişti (inclusiv geneticieni)

precum şi explorări genetice. Dar orice practician, de la medicul de familie la specialist, trebuie să ştie *cum să procedeze* şi mai ales să fie convins că *stabilirea naturii bolii este decisivă* pentru determinarea evoluţiei (istoriei naturale) şi prognosticului bolii, îngrijirea bolnavului, evaluarea riscului genetic de recurenţă în familia sa precum şi a posibilităţilor de reducere a acestui risc. În aceste condiţii el nu va ignora anamneza familială şi va şti ce explorări genetice să recomande.

Medicului practician trebuie să-i fie familiare o serie de concepte genetice: pleiotropie, expresivitate variabilă, penetranţă, heterogenitate genetică, fenocopii, moduri de transmitere şi riscuri genetice. Aceasta nu înseamnă nicidecum că practicianul se va substitui specialistului în genetică medicală ci numai că el va realiza o „medicină de bună calitate" aplicând principiile geneticii sau, pe scurt, „o medicină genetică". Ţinând cont de rolul tot mai important al factorilor genetici în determinismul bolilor şi de faptul că în orice specialitate medicală există o patologie genetică această abordare genetică a bolilor este deja o componentă de rutină a îngrijirii bolnavilor.

După stabilirea diagnosticului clinic şi etiologic este absolut necesară *informarea pacientului* sau a familiei sale (în cazul unui copil sau al unei persoane cu handicap) asupra naturii bolii, evoluţiei şi consecinţelor ei. Această acţiune este importantă, plină de responsabilitate; ea necesită nu numai dibăcie de comunicare ci şi cunoştinţe precise despre genetica bolii respective. Orice medic trebuie să fie conştient de necesitatea unei pregătiri fundamentale prealabile, care îi va permite, cu ajutorul unei biblioteci şi a internetului, să capete informaţiile necesare procesului de informare a pacientului. Apoi, el se va implica – direct sau indirect – în informarea şi evaluarea altor membri ai familiei bolnavului.

(3). Familia ca unitate de acţiune.

"Abordarea genetică este o atitudine care reflectă obligaţia medicului *de a asista nu numai bolnavul ci şi familia sa*…pentru a evita apariţia sau recurenţa bolii în familie…Prin aplicarea curentă a acestei atitudini, clinicianul poate contribui efectiv la *prevenirea bolilor genetice"*. Această acţiune derivă din esenţa eredităţii ce implică transmiterea genelor mutante la alţi membri ai familiei. Medicul poate identifica alte cazuri nediagnosticate (deseori oligo-simptomatice), precum şi persoane sănătoase dar cu risc de a fi moştenit gena mutantă.

În funcţie de tipul de boală – monogenică, recesivă sau dominantă (eventual cu debut mai tardiv) sau multifactorială – se va acorda un sfat genetic adecvat şi se va recurge eventual la un diagnostic presimptomatic / prenatal (vezi capitolul 9). Chiar dacă medicul de familie nu poate să îndeplini toate sarcinile ce decurg din această atitudine, el este obligat să se asigure că familia le cunoaşte şi, prin trimiterea la alţi specialişti, familia primeşte îngrijirea competentă necesară.

A devenit evident că *„nu există boli ci numai...familii de bolnavi"* iar familia este o unitate de acţiune. În acest context, în afara de cunoştinţe, dublate de abilitatea de comunicare, medicul trebuie ţină cont de implicaţiile psihologice posibile şi să aplice principiile bioeticii: respectul confidenţialităţii, consimţământul informat, dreptul de a nu ştii etc.

INTERNET

1. Pharmacogenetics Research Network, US National Institute of General Medicine: http://www.pharmagkb.org/pdfs/model.pdf
2. Aplicarea cercetărilor farmacogenetice în industrie: http://www3.diahome.org/committees/pharmacogenetics
3. Polimorfismul mononucleotidic (SNPs): http://www.snp.cshl.org/index.html
4. Farmacogenetica citocromului P450: http://www.imm.ki.se./cypalleles
5. Genethon (France): http://www.genethon.fr
6. National Center for Genomic Resources: http://www.ncgr.org
7. National Human Genome Research Institut: http://www.nhgri.nih.gov

Bibliografie specifică selectivă

1. Abel l, Casanova JL. – *Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging the gap between simple and complex inheritance* – Am. J.Hum.Genet. 2000;67:274-277
2. Brinkmann U., Roots J., Eichelbaum M. – *Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1; impact of polymorfisms on pharmacotherapy* – Drug Discovery, 2001, 6:16, 835-840
3. Cooke G.S., Hill A.V.S. - *Genetics of susceptibility to human infectious disease* - Nat. Rev. Genetics, 2001; 2: 967-977.
4. Costa L.G. - *The emerging field of ecogenetics* - Neurotoxicology. 2000; 21: 85-89.
5. Evans WE, McLeod HL. - *Drug therapy: pharmacogenomics-drug disposition, drug targets and side effects* - N.Engl.J.Med 2003;348:538-549
6. Guţiu I.A. **–** *Farmacogenomica – cea mai nouă ramură a geneticii medicale. Aplicaţii în cardiologie*, Farmacia, 2001, XLIX,2, 53-66
7. Motulsky AG – *Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects and folic acid* – Am.J.Hum.Genet. 1996;58:17-20.
8. Mukherjee D., Topol E. : *Pharmacogenomics in Cardiovascular Diseases* – Progres in Cardiovascular Diseases, 2002, 44, 6, 479-98
9. Nagao M, Ochiai M, Ushijima T, Watanabe M, Sugimura T, Nakagama H. - *Genetic determinant and environmental carcinogens*. - Mutat. Res. 1998; 402: 85-91.
10. Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. - *Human drug-metabolizing enzyme polymorphism: effects on risk of toxicity and cancer* – DNA Cell Biol. 1996;15:273-280.
11. Kalow W, Grant DM. – *Pharmacogenetics* – in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited diseases, 7th ed, McGraw-Hill, New York, 1995, 1981-2030
12. Kalow W.– *Pharmacogenetics in biological perspective*, Pharmacol. Reviews, 1997, 49, 4, 369-380
13. Reich T, Hinrichs A, Beirut L. – *Genetic studies of alcoholism and substance dependence* – Am.J.Hum.Genet.1999; 65:599-605
14. Roden D. M., George A. L. Jr - *The genetic basis of variability in drug responses* , Drug Discovery 2002, 1, 37-44
15. Roses A. D.– *Pharmacogenetics*, Human Molec. Genetics, 2001, 10, 20, 2261-2267
16. Sadée W.– *Pharmacogenomics*, BMJ, 1999, 319:1286
17. Shi M. M., Bleavin M.R. , Iglesia F.A. **–** *Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials***,** Drug Metab. and Disp., 2001, 29, 4, 591-595
18. Stoica O., Braha E., Ungureanu G. : *Terapeutica medicamentoasă la începutul erei genomice* – Rev. Med. Chir. Soc. Nat. Iaşi, 2002, 106, 2-3
19. Weinsihilboum R. – *Genomic medecine: Inheritance and drug Response* – N.Engl.J.Med 2003;348:529-537
20. Wolf C R., Smith G. , Smith R. L. – *Pharmacogenetics* , BMJ, 2000, 320: 987-990.

CAPITOLUL 9

CONSULTUL **ŞI SFATUL GENETIC**

Bolile genetice şi malformative sunt foarte *diverse*, se manifestă la vârste diferite şi afectează orice sistem sau organ; de aceea bolnavii cu aceste afecţiuni se pot adresa diferitelor categorii de medici specialişti. În consecinţă, cunoaşterea unor principii de genetică medicală este *necesară şi utilă oricărui practician* confruntat cu patologia genetică, care trebuie să ştie şi să aplice metodologia generală a *consultului genetic*, să indice adecvat efectuarea unor *explorări genetice*, să înţeleagă şi să interpreteze corect rezultatele lor şi, nu în ultimul rând, să poată *sfătui genetic* – în limitele sale de competenţă – în mod corect pacientul şi/sau familia sa, confruntată cu un risc genetic.

A. CONSULTUL GENETIC

1. DEFINIŢIE. OBIECTIVE.

Consultul genetic *este un act medical specializat şi complex prin care se pune sau se evaluază diagnosticul unei boli, se precizează natura sau componenta sa genetică şi se acordă un sfat genetic bolnavului sau familiei sale*.

- Primul obiectiv al consultului genetic este *realizarea unui diagnostic clinic cât mai precis posibil*; acest lucru este deseori dificil dar absolut necesar deoarece, mai mult decât în alte specialităţi, el condiţionează direct prognosticul, calitatea îngrijirii medicale, prevenirea complicaţiilor şi corectitudinea sfatului genetic, de care depind opţiunile reproductive ale pacientului sau cuplului.
- Al doilea obiectiv este *stabilirea naturii sau a componentei genetice a bolii*; aceasta este o activitate specifică medicului genetician care (pe baza istoricului familial şi explorărilor genetice) trebuie să diferenţieze bolile genetice de cele condiţionate genetic sau negenetice.
- Al treilea obiectiv al consultului genetic este acordarea *sfatului genetic*, o acţiune absolut caracteristică consultului genetic, prin care bolnavul sau rudele cu risc sunt sfătuiţi în ce priveşte: *natura şi consecinţele bolii* (istoria naturală, prognosticul), *riscul de recurenţă şi căile prin care riscul poate fi redus sau prevenit* (opţiunile reproductive, posibilităţile de diagnostic prenatal).

Deci, consultul genetic este un act medical complex care presupune o pregătire solidă, o mare disponibilitate de colaborare cu alţi specialişti, deci într-o echipă în care *geneticianul reprezintă punctul de convergenţă* (decizie), care stabileşte concluziile finale. Nu în ultimul rând, este nevoie de *o infinită dorinţă de a ajuta şi alina* bolnavii confruntaţi cu un handicap pentru o viaţă, precum şi pe părinţii lor ce trăiesc drama unei neîmpliniri şi tragedia unui destin genetic potrivnic.

2. CADRUL ORGANIZATORIC

Consultul genetic este realizat de către un **medic genetician** care trebuie să aibă o pregătire medicală de *bază* – pentru a înţelege boli ce afectează orice organ, la orice vârstă[1] – precum şi o pregătire *specifică* în domeniul geneticii medicale, solidă şi mereu actualizată. În

[1] *„...geneticienii clinicieni sunt probabil ultimii generalişti adevăraţi în medicina actuală”* (Hall, 1999).

plus, medicul genetician trebuie să posede anumite trăsături de personalitate şi *calităţi psihologice* pentru a putea face faţă dificultăţilor inerente pe care le ridică diagnosticul şi îngrijirea bolnavilor.

Abordarea corectă şi completă a patologiei genetice şi malformative nu se poate realiza decât în **Servicii (Centre) de genetică medicală** specializate (vezi secţiunea D). *Obiectivul* principal al acestor servicii este de a răspunde necesităţilor individului şi familiei care sunt confruntaţi cu o boală genetică, în special dorinţei lor de a şti dacă au sau nu un risc de a dezvolta sau transmite o boală cu o componentă genetică.

Serviciile de genetică se deosebesc de alte servicii medicale pentru că:

- realizează diagnostic, investigaţii şi îngrijiri medicale pentru boli care afectează *orice sistem de organe şi la orice vârstă* ; acest lucru implică multiple investigaţii, în diferite specialităţi; planificarea, coordonarea şi centralizarea rezultatelor revine medicului genetician.
- *unitatea de studiu este familia* şi nu individul;
- *acordă sfat genetic*, caracteristică definitorie a serviciilor de genetică;
- cuprind într-o structură integrată – clinică şi de laborator – o *echipă multidisciplinară* de personal medical (geneticieni) şi non-medical (psihologi, biologi, asistenţi sociali, etc)

3. INDICAŢIILE CONSULTULUI GENETIC

În mod obişnuit, consultul genetic este solicitat de un pacient sau un cuplu, confruntaţi cu o problemă de "genetică".

- *Pacientul bolnav* – cu o afecţiune posibil genetică sau cu o anomalie congenitală – solicită diagnostic, îngrijire şi/sau evaluarea riscului de recurenţă la descendenţi.
- *Pacient sănătos,* dar cu risc genetic crescut (are o rudă apropiată afectată) – doreşte să ştie dacă "va face" boala (diagnostic pre-simptomatic) sau dacă va transmite o genă mutantă la urmaşi; mult mai rar el solicită un sfat premarital, determinat de o viitoare uniune consanguină (de regulă veri).
- *Cuplu sănătos* – poate solicită diagnostic şi sfat genetic:
  - *preconcepţional* – în situaţia unor rudeafectate, când vârstă maternă depăşeşte 35 de ani, există tulburări de reproducere (infertilitate) sau consanguinitate.
  - *prenatal* – în cazul unor antecedente familiale pozitive, după expunerea la teratogeni sau după identificarea unor semne ecografice de alarmă;
  - *postnatal* – după naşterea unui copil afectat (anomalii congenitale) sau atunci când la un copil apar tulburări de creştere sau dezvoltare psihomotorie, boli metabolice, tulburări pubertare);

4. PRINCIPIILE DE BAZĂ ALE CONSULTULUI GENETIC

Complexitatea consultului genetic impune aplicarea unor principii de acţiune. Pe baza experienţei dobândite în acest domeniu propunem următorul „decalog":

(1) *Evaluarea pacientului şi familiei sale se va face metodic, în etape sau trepte succesive de acţiune,* fiecare cu obiective şi activităţi distincte. Avantajul acestui „mod de lucru" – valabil pentru *orice medic* confruntat cu patologia genetică şi malformativă – este reprezentat nu numai de coerenţă şi finalitate, ci mai ales de faptul că permite obţinerea celor mai bune rezultate medicale şi psihologice în condiţiile proprii examinatorului.

(2) *Examenul clinic este decisiv*, chiar în condiţiile medicinii moderne dominată de tehnologii sofisticate şi performante; „întoarcerea" la genetica clinică este absolut necesară deoarece *„...fără fenotip nu poate exista un genotip iar fără clinică nu există fenotip"*.

(3) O atenţie egală se va acorda şi *anamnezei personale şi, mai ales, anamnezei familiale* – care furnizează informaţii preţioase pentru diagnosticul şi managemenul pacientului şi familiei sale. Succesul acestei acţiuni va depinde de tehnica şi perseverenţa medicului (care trebuie să

se convingă de veridicitatea faptelor), precum şi de timpul alocat (*carenţa factorului T – timp – este una din „bolile profesionale" ale medicului actual*) .
(4) Începând de la primul contact cu pacientul şi familia sa şi apoi în toate etapele diagnosticului, *procesul de evaluare va fi dublat şi de un sprijin psihologic, atent şi constant*. Medicul va trebui să susţină şi să încurajeze permanent familia pacientului, confruntată acut cu o situaţie dramatică.
(5) În aceste condiţii, se va acorda o atenţie specială şi un timp adecvat *procesului de comunicare*, care va fi simplu şi clar, adaptat fiecărei etape de acţiune (explicând ce se face şi de ce) şi nivelului de percepţie al pacientului/părinţilor, plin de înţelegere şi simpatie. Chiar dacă nu putem face multe pentru consultanzi în mod sigur putem să le alinăm suferinţa.
(6) *Problemele geneticii clinice se abordează şi se rezolvă „în echipă",* în sensul larg al cuvântului, fapt ce presupune *colaborări* eficiente cu alţi colegi, din diferite specialităţi clinice şi paraclinice, consultarea altor specialişti în genetică medicală pentru verificarea şi validarea concluziilor. Să nu uităm că diagnosticul genetic este „pus pentru o viaţă" şi consecinţele sale sunt imense.
(7) Medicul genetician reprezintă *punctul de convergenţă* al tuturor datelor despre consultanzi, obţinute în etape succesive, din surse variate. Acest lucru impune *adunarea, ordonarea şi interpretarea datelor* sau, cu alte cuvinte, *un stil special de lucru*, ce trebuie dublat de *răbdare şi prudenţă,* pentru a evita concluzii şi diagnostice pripite, până ce faptele nu vor fi bine stabilite şi documentate. Este mai bine să nu greşim decât să punem un diagnostic „cu orice preţ"
(8) Arta diagnosticului genetic se bazează pe un *un fond solid şi complet de cunoştinţe „bazale"*, reprezentat de cunoaşterea morfologiei şi înţelegerii morfogenezei normale şi anormale, precum şi a principiilor de genetică umană şi medicală; acest fond de cunoştinţe *catalizează* un diagnostic deoarece permite „ochilor minţii" să se îndrepte spre elemente ce altfel ar putea fi omise. Cu timpul se va adăuga o experienţă necesară dar *actualizarea permanentă a cunoştinţelor* rămâne obligatorie.
(9) Este cert că nimeni nu poate şti totul în genetica clinică iar pentru „începători" numărul mare de entităţi genetice este foarte descurajant; în aceste condiţii *biblioteca, computerul şi Internetul* sunt soluţiile salvatoare. Geneticianul trebuie obligatoriu să stăpânească accesul *online* la informaţii şi baze de date.
(10) NU este posibil totdeauna un diagnostic clinic şi genetic dar – după principiul „nu ai reuşit, continuă" – medicul genetician trebuie să aibă abilitatea de a fi *răbdător şi tenace,* atunci când nu a reuşit un diagnostic specific şi precis. De aceea, *urmărirea în timp* a bolnavului şi familiei sale va aduce cu siguranţă beneficii diagnostice şi de îngrijire.

5. ETAPELE CONSULTULUI GENETIC

Aşa cum am precizat, evaluarea pacientului şi familiei sale se va face metodic, *în etape sau trepte succesive de acţiune* (figura 9.1), fiecare cu obiective şi activităţi distincte:

- Evaluarea iniţială a bolnavului (anamneză, examen fizic);
- Alte examene clinice şi explorări paraclinice;
- Analiza şi interpretarea datelor;
- Explorări genetice;
- Finalizarea consultului genetic;
- Comunicarea concluziilor;
- Urmărirea evoluţiei bolnavului;
- Contactarea rudelor cu risc genetic crescut

În toate etapele, procesul de evaluare va fi dublat şi de un *sprijin psihologic* corespunzător.

5.1. CONTACTUL INIŢIAL CU BOLNAVUL

Primul contact cu bolnavul, deseori copil însoţit de cineva din familie, este important pentru a stabili o atmosferă de încredere şi cooperare. Deobicei se începe cu întrebările clasice prin care se stabileşte "*motivul consultaţiei*" şi problemele majore care frământă pacientul sau familia sa. Stabilirea „obiectivului" consultaţiei va concentra atenţia medicului asupra anumitor probleme şi va permite şi stabilirea „nivelului de anxietate " al consultanzilor.

Perioadă iniţială "de acomodare reciprocă" (uneori foarte necesară) poate fi prelungită prin *analiza documentelor medicale* existente din care important este să se identifice elementele obiective. Urmează apoi anamneza detaliată şi examenul fizic, minuţios şi complet.

5.2. ANAMNEZA

Anamneza se desfăşoară pe două direcţii majore: anamneza personală şi familială.

a. Anamneza medicală personală vizează toate etapele vieţii individului şi, evident, istoricul bolii. Desigur, vârsta pacientului şi tipul de patologie vor influenţa *secvenţa şi ponderea informaţiilor*. Schematic, putem deosebi:

(1) *Anamneza gestaţională* – care se va referi la concepţie, evoluţia sarcinii şi naştere.
- *Concepţia* – antecedentele reproductive şi vârsta părinţilor, eventualele lor boli conice (diabet zaharat, epilepsie ş.a), grupele sanguine, data debutului sarcinii;
- *Evoluţia sarcinii* – boli şi expuneri teratogene în trimestrul I, apariţia şi evoluţia mişcărilor fetale, cantitatea de lichid amniotic şi datele ecografice;
- *Naşterea* – vârsta gestaţională, durata travaliului, prezentaţia, anomalii ale lichidului amniotic, cordonului ombilical şi placentei, scorul APGAR/reanimarea nou-născutului, datele morfologice (greutate, talie, perimetru cranian).

Din analiza acestor date se pot reţine o serie de "semnale de alarmă", utile în analizele ulterioare (vezi secţiunea A.5.5).

(2) *Anamneza neonatală* este la fel de importantă deoarece dificultăţile în „adaptarea copilului la viaţa extrauterină" sau o serie de manifestări anormale pot semnala malformaţii şi/sau malfuncţii congenitale. Dintre acestea menţionăm: crize de apnee, dificultăţi de sugere, vărsături, hipotonie, convulsii, cianoză, icter prelungit.

(3) *Anamneza postnatală* – vizează evaluarea creşterii, a dezvoltării psihomotorii şi sociale (achiziţii motorii, comportament, limbaj, performanţe etc), bolile copilăriei şi – atunci când este cazul – ale dezvoltării pubertare.

(4) *Istoricul bolii pacientului*: momentul debutului, manifestări, evaluări clinice şi paraclinice, îngrijiri medicale etc. Dar, atenţie, ar fi o mare greşeală să ne limităm la anumite elemente; trebuie puse întrebări specifice despre funcţionarea tutror organelor *(„revista sistemelor")* pentru identificarea unor elemente corelate cu boala de bază.

b. Anamneza familială.

(1) Definiţii, importanţă, condiţii.

Anamneza familială reprezintă, în esenţă, o sumă de informaţii despre relaţiile biologice şi sociale/legale, despre starea fizică şi mentală a indivizilor familiei precum şi despre funcţia lor reproductivă. Aceste informaţii se se înregistrează şi se reprezintă grafic într-o formă standardizată denumită **arbore genealogic** (în engleză, *pedigree*).

Orice manual de semeiologie subliniază utilitatea istoricului familial *direcţionat* (antecedentelor familiale sau „heredo-colaterale") ca etapă primară a evaluării bolnavului şi orice Foaie de observaţie folosită în clinică are o secţiune distinctă pentru acest istoric. Deseori această acţiune este „expediată" prin câteva întrebări banale şi în rubrica corespunzătoare se scrie „nimic de semnalat". Această atitudine reflectă grabă, superficialitate sau, poate, o minimalizare a problemei; un celebru profesor de semeiologie spunea *„a nu reuşi să iei un istoric familial corect este o practică medicală rea, care uneori poate fi o neglijenţă criminală"* (Child, 1882). Într-adevăr, anamneza familială poate furniza informaţii decisive pentru: diagnosticul medical; decizia strategiilor de testare; stabilirea modului de transmitere; determinarea riscului de recurenţă; identificarea persoanelor cu risc genetic crescut, etc

Datorită importanţei sale, anamneza familială necesită o *tehnică* perfectă (inclusiv în realizarea unei bune colaborări cu familia pacientului), *acurateţe, timp şi eficienţă*. Aceste

raţiuni ne determină să prezentăm pe larg metodologia anamnezei familiale şi construirii unui arbore genealogic. Vom face însă, mai întâi, câteva precizări generale.

- Realizarea unui istoric familial se face de obicei de către medicul consultant printr-un *interviu „faţă în faţă”* (cu pacientul sau părinţii săi, dacă este copil), într-o ambianţă comfortabilă, fără elemnte perturbatoare, şi care să asigure confidenţialitatea relatărilor.
- Arborele genealogic începe deobicei cu individul care solicită consultaţia genetică (pentru evaluare, sfat sau testare genetică) şi care poate fi sau nu afectat; el se numeşte **consultand**. Pentru prima persoană bolnavă care aduce familia în atenţia medicală se foloseşte termenul de **proband** (denumit şi propositus sau caz index, mai ales în lucrări ştiinţifice). Deseori consultandul şi probandul sunt aceeaşi persoană, dar în familie pot fi mai mulţi consultanzi.
- Efectuarea arborelui genealogic este o componentă a evaluării medicale, ce devine document medical; deaceea se va face cu cerneală[2] permanentă, pe o hârtie „oficială” şi într-o formă standard (de obicei A4, în lung, cu antet).

  În antet se va preciza obligatoriu: serviciul, numărul Fişei de consult genetic, data, numele şi prenumele consultandului / probandului, numele persoanei care relatează datele şi al examinatorului, motivaţia consultului, eventual etnia şi existenţa consanguinităţii precum şi legenda simbolurilor particulare sau abrevierilor.

  Vom sublinia foarte clar că realizarea unei reprezentări corecte, precise şi uşor de interpretat este nu numai o obligaţie ci şi o probă de profesionalism.
- Istoricul familial are o mare încărcătură psihologică şi emoţională deoarece medicul „pătrunde” în esenţa vieţii individului şi familiei, a relaţiilor lor intime, ce reflectă *o istorie umană unică*. Medicul trebuie să fie prudent, politicos, sensibil la unele aspecte culturale, etnice, religioase sau socio-economice, foarte atent la credinţe şi obiceiuri. Obţinerea informaţiilor despre istoricul familial reprezintă însă o excelentă oportunitate pentru examinator de a stabili *o relaţie de încredere* cu pacientul şi/sau familia sa, de a face *observaţii psihologice* utile privind consultanţii: interacţiunea dintre cuplu şi familie, nivelul de stress al persoanelor, ideile şi miturile lor privind cauzalitatea bolii, sentimentul de vinovăţie, timiditate etc. Multe răspunsuri şi reacţii vor depinde de limbajul folosit şi calitatea întrebărilor.

(2) Simboluri şi informaţii standard folosite în realizarea arborelui genealogic.

Pentru construcţia arborelui genealogic se vor folosi simboluri şi abrevieri standardizate (figurile 9.2 şi 9.3).

- Un bărbat este desenat printr-un *pătrat* şi, dacă este posibil, se va plasa la stânga unei partenere, o femeie desenată printr-un *cerc*. Probandul şi consultandul vor fi obligatoriu identificaţi printr-o *săgeată*, însoţită de litera P pentru proband (figura 9.2).
- Relaţiile dintre indivizii familiei se marchează prin patru tipuri de linii (figura 9.3): *linia de legătură* uneşte doi parteneri; dacă s-a produs separarea lor, linia de legătură se va întrerupe cu două liniuţe oblice, iar dacă partenerii sunt înrudiţi se va desena o linie dublă. *Linia descendenţei* merge vertical (sau oblic, dacă nu avem spaţiu suficient) până la *linia orizontală a fratriei*, din care se desprinde – pentru fiecare frate-soră – *linia individului*. Simbolurile pentru membrii din fiecare generaţie se desenează pe acelaşi rând, iar în fratrie de obicei în ordinea naşterii. Uneori, datele despre copiii sănătoşi se pot reda sintetic, printr-un *număr* (echivalent cu numărul de fraţi sau numărul de surori) plasat în interiorul simbolului de sex masculin sau feminin (figura 9.4).
- O sarcină în curs de evoluţie este simbolizată printr-un pătrat sau cerc, dacă se cunoaşte sexul, sau un *romb* (sex necunoscut) în care se scrie litera S (de la sarcină: unii preferă litera P de la *pregnancy*); sarcinile care nu evoluează la termen (avort spontan sau întrerupere) – sunt reprezentate printr-un *triunghi* (sub care se scrie sexul, dacă se cunoaşte) iar linia individului va fi mai *scurtă*. În figura 9.3 sunt prezentate semnele pentru gemeni şi copii adoptaţi sau plasaţi în adopţie.
- Fiecare persoană afectată se va reda printr-un *simbol haşurat*; dacă sunt mai multe afecţiuni simbolul va fi împărţit în *sectoare*, fiecare reprezentând o boală (figura 9.4); acelaşi sistem se foloseşte şi pentru afecţiunile cu expresivitate variabilă dar, în acest caz, fiecare sector va corespunde unei manifestări clinice majore; în ambele cazuri semnificaţia fiecărui cadran se va menţiona în legendă.

---

[2] Unii preferă creionul şi radiera pentru corecţiile ce pot apărea în cursul relatării; în această variantă, la final se va redesena arborele genealogic în cerneală, cu atenţie pentru a nu omite date.

- O linie diagonală ce trece printr-un simbol (pătrat, cerc, romb, triunghi) semnifică faptul că individul respectiv a *decedat*.
- Chiar dacă se folosesc simboluri standardizate este obligatoriu să se includă, pe foaia cu arborele genealogic, o *legendă* care va cuprinde informaţiile necesare interpretării.

Arborele genealogic va cuprinde de asemenea o serie de *informaţii standard* despre persoanele incluse, notate clar, complet sau abreviat (tabelul 9.1). Dacă informaţiile nu sunt certe este preferabil să se pună tilda ~ iar dacă nu se cunosc date despre istoricul familial al ascendenţilor sau descenedenţilor se va pune semnul de întrebare (?).

Tabelul 9.1 Informaţii incluse în arborele genealogic

- Vârsta/data naşterii sau anul de naştere al pacientului şi membrilor familiei sale
- Vârsta la deces şi cauza decesului (d); pentru nou-născuţii morţi (nm) se notează vârsta gestaţională
- Statusul pacientului: afectat /sănătos (definit în legendă, prin umbrirea simbolului)
- Vârsta debutului bolii şi/sau diagnosticului bolii.
- Caz evaluat personal sau documentat medical (*)
- Statusul testării (E – definit în legendă)
- Informaţii relevante pentru sănătate (ex.,talie, greutate)
- Sarcină (S); se notează data UM sau VG (spt)
- Complicaţiile sarcinii: avort spontan (AVS), sarcină ectopică (ECT), întreruperea sarcinii (TS)
- Inferilitate sau opţiune de a nu avea copii
- Etnia bunicilor
- Consanguinitate

(3) Metodologia istoricului/anamnezei/ familial(e)

Medicul genetician va începe anamneza familială explicând pe scurt pacientului şi/sau părinţilor scopul şi utilitatea informaţiilor despre familie şi garantând păstrărea confidenţialităţii lor. Realizarea istoricului familial şi construcţia arborelui genealogic se va face *„pas cu pas”*; întrebările se pun *secvenţial*, ghidând pacientul spre lucrurile relevante (prin întrebări directe şi specifice) şi desenând concomitent (pe o foaie standard) arborele genealogic, pe baza răspunsurilor.

Se va începe cu consultandul, marcând toate datele precizate mai sus. Dacă este un adult şi are o parteneră aceasta se va trece pe arbore (ambii se plasează de obicei în centrul paginii). Urmează, în ordine cronologică rudele apropiate: copiii şi/sau sarcinile, fratria, părinţii şi bunicii paterni şi materni – înregistrându-i pe aceeaşi linie ce corespunde generaţiei lor şi stabilind orice factor adiţional care ar putea avea consecinţe asupra evaluării riscului. Dacă despre unii ascendenţi sau descendenţi nu sunt suficiente date se va pune în dreptul lor un semn de întrebare. Dacă este un copil se vor marca părinţii şi fratria, iar apoi rudele de gradul doi şi trei. Pentru fiecare membru al familiei se întreabă despre starea de sănătate. Se notează dacă este „viu şi sănătos” (de ex., V&S) sau bolnav; întrebările despre starea de boală pot fi mai generale sau ţintite, fie pentru fiecare sistem de organe fie pentru anumite manifestări ale unei boli, atunci când există un diagnostic. Se va insista asupra: fondului etnic (ţara de origine, naţionalitatea familiei, religia), înrudirii /consanguinităţii şi se va avea totdeauna în minte întotdeauna *posibilitatea non-paternităţii*, a unor parteneri multipli, a unor copii înfiaţi sau adoptaţi.

Este obligatorie *documentarea* fiecărui caz de boală (înregistrări medicale, rezultate de laborator, necropsie etc – obţinute cu consimţământul scris al pacienţilor) şi eventual *evaluarea* lui directă de către medicul consultant; toate datele vor fi trecute/anexate ordonat în fişa de consult. În aceste situaţii documentate, pentru a le deosebi de acelea relatate (din amintiri) de către consultand sau familie, cazul se va marca cu asterisc (*). Evaluările clinice sau testele (de ex., CT/RMN, cariotip, teste moleculare) se notează cu litera **E** (de la evaluare); dacă s-au făcut mai multe evaluări acestea se vor nota cu $\mathbf{E_1}$, $\mathbf{E_2}$; se poate menţiona rezultatul: normal ”–” sau anormal ”+” sau ”ns” (nesemnificativ/ noninformativ) (figura 9.5).

La încheierea interviului, medicul trebuie să-i dea „o şansă în plus” interlocutorului pentru relatarea unor situaţii particulare (*„… există altceva despre care nu v-am întrebat şi pe care Dv credeţi că este important ca eu să ştiu?”*) şi pentru cazurile de boală (mai ales în sindroame dismorfice, a căror manifestare se poate schimba în timp) va solicita consultarea „albumului de familie”, pentru a urmări evoluţia fenotipului pacienţilor.

La finalizarea diagnosticului *se va reveni* asupra istoricului familial deoarece întrebările pot fi mai precis direcţionate spre manifestările oligosimptomatice de boală. De asemenea cu ocazia evaluărilor ulterioare datele familiale obţinute vor fi *reactualizate.*

(4) Interpretarea anamnezei familiale şi analiza arborelui genealogic.

Anamneza familială poate fi:

- *pozitivă*[3] – atunci când sunt identificate şi alte persoane afectate;
- *negativă dar informativă* – pacientul este singurul bolnav dar unele date sunt utile: vârsta părinţilor (a bunicului patern pentru bolile legate de X), existenţa consanguinităţii etc;
- *negativă şi neinformativă* – fie prin lipsa cunoaştinţelor despre familie, tehnică neadecvată, alte cauze (abateri de la paternitate, mutaţii noi sau fenocopii, boli recesive sau multifactoriale etc), fie pur şi simplu pentru că pacientul este un caz sporadic.

Geneticianul trebuie să interpreteze cu grijă datele sintetizate în arborele genealogic al familiei pentru a stabili corect riscul de recurenţă şi persoanele cu risc. Pentru aceasta va lua în calcul toate modalităţile de transmitere ereditară şi va fi foarte atent la fenomenele de expresivitate variabilă, penetranţă (inclusiv dependentă de vârstă) şi heterogenitate genetică (descrise în detaliu în capitolul 5.D şi E).

5.3 EXAMENUL FIZIC

Examenul fizic este decisiv în genetica medicală şi dismorfologie deoarece reprezintă, împreună cu istoricul medical, „fundaţia" unui diagnostic clinic corect şi complet. El este prima probă a calificării unui clinician şi necesită:

- *condiţii optime* (pacient cooperant şi relaxat, lumină şi temperatură optimă, iar pentru copii – prezenţa mamei);
- o *tehnică impecabilă,* ce include o evaluare metodică şi completă, atentă şi minuţioasă;
- abilitatea de a fi un *observator priceput*; această abilitate se obţine în timp, fiind atent la detalii şi dezvoltând simţurile (aprecierea) mărimii, proporţiei, poziţiei şi simetriei; dismorfologia este în principal o *specialitate vizuală*;
- *un fond de cunoştinţe „bazale",* reprezentat de cunoaşterea morfologiei şi înţelegerea morfogenezei normale şi anormale.

Evaluarea genetică medicală se bazează pe examinarea fizică standard, a copilului sau adultului (Bates, 1983), dar conţine anumite elemente particulare, generate de prezenţa dismorfiilor, produse de tulburări ale procesului de morfogeneză.

a. Examinarea generală

Componentele de bază ale examinării fizice generale ale unui bolnav sunt:

- evaluarea semnelor vitale (frecvenţă cardiacă, respiratorie, presiune arterială);
- determinarea parametrilor de creştere (talie, greutate, perimetru cranian), habitusul general al corpului şi proporţiile sale;
- evaluarea generală a stării de sănătate şi statusului nutriţional;
- examinarea metodică a sistemelor şi structurilor anatomice; ordinea examinării poate varia în funcţie de vârsta pacientului şi acuzele principale dar esenţial este ca examenul să fie complet.

b. Examenul dismorfologic

Are ca obiectiv recunoaşterea *formelor anormale* (dismorfii) şi deci identificarea unor anomalii minore, ce pot realiza un *model* caracteristic.

Uneori **diagnosticul este instantaneu**[4] deoarece multe sindroame au un *aspect (facial) stereotip,* care permite o recunoaştere rapidă, un diagnostic vizual şi mental imediat (de exemplu: sindromul Down, acondroplazia, s.a.).

---

[3] Termenii de „anamneză *pozitivă*" şi „anamneză *negativă*" au de fapt o semnificaţie inversă, ce poate deruta uneori pacientul. Ar fi de preferat evitarea celor două adjective, eventual printr-o perifrază.

[4] Pentru diagnosticul instantaneu al unor sindroame se foloseşte, pe toate meridianele, un cuvânt derivat din germană – *gestalt*.

Acest tip de diagnostic se bazează pe abilitatea naturală a omului de a fixa imaginile (în special cele faciale) în memorie şi de a le evoca (aminti) când este necesară o comparare şi recunoaştere. Dismorfologii nu fac de obicei eforturi speciale de memorizare vizuală ci mai curând *descompun* imaginile pacientului în elemente fizice individuale şi apoi *le recompun* într-un model unic, specific unui sindrom. Pentru medicul practician nu este utilă memorarea sutelor de sindroame ci în special cunoaşterea unor semne evocatoare pentru unele dintre ele şi apoi folosirea atlaselor (Jones, 1997; Gorlin et al, 2000; ş.a) sau bazelor de date (POSSUM, LDDB)

Recunoaşterea instantanee necesită o experienţă dobândită în timp şi poate duce frecvent la erori fie din cauza manifestării variabile a sindroamelor, fie datorită tentaţiei de a pune un diagnostic rapid (înainte de a se finaliza o evaluare completă a pacientului sau ignorând unele elemente clinice semnificative).

De cele mai multe ori **diagnostic este analitic**, batându-se pe *o evaluare clinică completă şi minuţioasă*. Se vor observa cu atenţie şi se vor descrie corect (cu termenii specifici ai semeiologiei malformative) *forma, mărimea, proporţiile, poziţia, conturul, pliurile, spaţierea, simetria* – tuturor elementelor anatomice (a căror morfologie normală, cu variantele descrise, trebuie bine cunoscută). O atenţie deosebită se va acorda anomaliilor minore – modificări subtile ale unor structuri. Inspecţia loco-regională a *structurilor de suprafaţă* se va completa cu palparea lor şi cu o serie de manevre active.

Evaluarea va fi *calitativă* (absent/prezent-detalii) *şi/sau cantitativă* pentru structurile ce pot fi *măsurate obiectiv* (cu tehnici corecte şi instrumente adecvate) pentru a constata (prin comparaţie cu *standardele de vârstă şi sex*) o deviere semnificativă (> ± 2DS) de la normal. Vom preciza totuşi că nici un set de măsurători nu va înlocui gândirea clinică în determinarea prezenţei şi semnificaţiei variaţiilor morfologice.

Un mijloc preţios de obiectivare şi comparare este *fotografia clinică* de foarte bună calitate (digitală dacă se poate), precum şi înregistrarea video, obligatorii pentru dismorfologi; imaginile sunt mai bune decât orice descriere detaliată.

O situaţie particulară o reprezintă *examenul fizic al nou-născutului mort*.

În acest caz se vor parcurge următoarele etape: stabilirea vârstei gestaţionale; măsurarea taliei, greutăţii, perimetrului cranian; examinarea fetusului, a cordonului ombilical (posibilitatea existenţei unei artere ombilicale unice) şi a placentei (mare, mică, prezenţa altor modificări); fotografierea generală şi pe segmente; efectuarea unei radiografii a întregului corp (*bebigramă*); necropsia sistematică şi atentă efectuată de către un fetopatolog; puncţia cardiacă (permite prelevarea unei cantităţi de sânge) sau biopsia cutanată, în vederea efectuării unui cariotip (având în vedere că 20% din cazuri sunt datorate unor boli produse de anomalii cromosomice) sau a unor analize ADN.

c. Înregistrarea şi sinteza datelor; planul de investigaţii.

În finalul evaluării, datele obţinute se vor înregistra corect, cu multă grijă, într-o „Fişă de consult genetic" – cu o structură standard care să faciliteze culegerea şi descrierea lor; pentru începători (şi nu numai) este utilă *o listă de semne* pe segmente şi regiuni sau o listă de semne pentru unele sindroame frecvente. Anomaliile vor fi *descrise precis* (folosind termenii dismorfologiei[5]) şi se va menţiona clar care dintre elemente sunt *certe sau probabile*,

Indiferent de modul de abordare al pacientului – instantaneu (*gestalt*) sau analitic – se va face *o sinteză primară a datelor obţinute*, stabilind care sunt anomaliile majore şi minore, certe şi probabile, precum şi distribuţia lor pe segmente şi/sau regiuni ale corpului. Pe această bază se vor formula mai multe *opţiuni posibile de diagnostic*. Acest lucru este necesar pentru a se va întocmi un *plan individual* de examene clinice de specialitate şi explorări paraclinice, care să valideze şi nuanţeze elementele identificate la examenul fizic şi să permită o diferenţiere între opţiunile diagnostice.

d. Informarea părinţilor.

La toate activităţile consultaţiei iniţiale (anamneză, examen fizic) se vor adăuga obligatoriu acţiuni de *susţinere psihologică* şi sfat medical a părinţilor/ cuplului/ bolnavului (figura 9.1). Nu trebuie să uităm că ei traversează o criză psihologică şi deaceea chiar de la acest

[5] Fiecare specialitate are „un limbaj" propriu care permite comunicarea dintre specialişti şi compararea cu datele literaturii de specialitate

prim contact ar trebui *să se înceapă procesul de consiliere*, care va evolua şi se va dezvolta o dată cu acţiunile de diagnostic şi îngrijire a bolnavului.

La sfârşitul evaluării medicul trebuie să prezinte – într-o formă simplă şi accesibilă – o schiţă a problemelor identificate (anomalii, semne, simptome) şi un plan de evaluare medicală şi îngrijire (management), fără un diagnostic detaliat sau informaţii despre riscul de recurenţă. Este adevărat că părinţii sunt nerăbdători dar trebuie explicat, cu prudenţă şi delicateţe că diagnosticul nu este de obicei o urgenţă şi cere timp; din aceste motive se recomandă un "diagnostic preliminar" cu descrierea anomaliilor şi o opinie rezervată asupra diagnosticului final. Chiar dacă procesul de diagnostic nu s-a încheiat este bine ca medicul consultant să *informeze şi în scris* asupra rezultatelor evaluării – pacientul/ părinţii săi, precum şi medicul care a trimis cazul.

5.4 ALTE EXAMENE CLINICE ŞI EXPLORĂRI PARACLINICE.

Datele obţinute prin anamneză şi examen clinic trebuie *validate şi confirmate* prin expertiza altor medici specialişti (colaboratori „antrenaţi" în studiul patologiei genetice şi malformative) şi a unor explorări paraclinice.

> Medicul genetician este, am mai spus acest lucru, *un soi de generalist* care, evident nu are priceperea unui specialist în evaluarea şi explorarea completă a unui organ. De aceea el va solicita colaborarea altor specialişti şi apoi va fi responsabil *de adunarea şi integrarea unitară a tuturor datelor obţinute de el,* prin anamneză şi examen fizic, preum şi ale acelora ce provin din alte evaluări clinice sau paraclinice

- Examenele clinice de specialitate vor fi „ghidate" printr-o *trimitere* ce va cuprinde elementele semnificative şi, eventual, supoziţiile de diagnostic, precizând – acolo unde este cazul – ce anume se urmăreşte.
- Testele funcţionale hepatice, renale, hematologice, metabolice, echilibrul acido-bazic şi electroliţii etc, vor fi adecvate (ţintite) modificărilor/ anomaliilor înregistrate.
- Evaluările radiografice, în special ale scheletului (vârstă osoasă, mărime craniu, lungime oase lungi, lungime oase mână etc), sunt necesare pentru diagnosticul displaziilor scheletice şi sindroamelor cu anomalii congenitale osoase.
- Studiile imagistice speciale – ecografie, ecocardiografie Doppler, CT, RMN – vor fi bine motivate şi „ţintite" pe anumite organe. Trebuie să subliniem că imagistica (printr-o gamă largă de explorări) completează anatomia de suprafaţă a dismorfologului cu o *anatomie de profunzime* şi este decisivă pentru anumite categorii de sindroame.

5.5 ANALIZA ŞI INTERPRETAREA DATELOR

Analiza şi interpretarea datelor anamnestice, clinice şi paraclinice referitoare la un pacient sau cuplu care solicită un consult genetic este o *etapă esenţială* deoarece orientează diagnosticul spre o anumită categorie de boli/sindroame genetice şi spre una sau câteva entităţi. Acţiunea cere timp pentru ca medicul să *adune* datele, să le *valideze* (documenteze) şi *ordoneze,* iar apoi, pe baza unei analize logice, să le *interpreteze*, să încerce să le explice şi coreleze. Abordarea interpretativă – ca alternativă la abordarea instantanee (gestalt) şi analitică – este o etapă de maturitate a unui sindromolog care trebuie să-şi explice ceea ce el observă. Diagnosticul necesită nu numai informaţii ci şi cunoştinţe, capacitate de analiză şi sinteză, experienţă.

a. Adunarea şi ordonarea datelor trebuie să se finalizeze cu stabilirea unor *„elemente de alarmă"* (tabelul 9.2) precum şi a anomaliilor/simptomelor *certe şi probabile*. Ele vor fi notificate pe o pagină distinctă a dosarului clinic al pacientului.

Tabelul 9.2 Semne de alarmă pentru existenţa unor malformaţii congenitale şi/sau sindroame plurimalformative

Vârstă maternă avansată (pentru anomaliile cromosomice)	Retard sau accelerare de creştere postnatală
Vârsta paternă avansată (pentru mutaţii noi)	Creştere disproporţionată (de ex., membre scurte)
Avorturi spontane repetate	Anomalii minore multiple
Anamneză familială semnificativă	Microcefalie

Prezentaţie pelvină	Întârziere în dezvoltarea psihomotorie
Întârziere de creştere intrauterină	Hipotonie ± contracturi
Perturbarea creşterii intrauterine a capului (de ex., microcefalie, evaluată prin ecografie)	Laxitate ţesut conjunctiv

b. Interpretarea datelor se va face prin prisma proceselor embriologice (timp de producere, tipuri şi corelaţii între anomalii, mecanism de producere, ş.a) şi a datelor genetice (categorii etiologice) – în mai multe etape, folosind eventual un algoritm de diagnostic

(1) Se va începe cu stabilirea precisă a existenţei unei **anomalii congenitale izolate (unice) sau a unor anomalii multiple** (tabelul 9.3). Acţiunea este decisivă pentru diagnosticul final şi depinde de *calitatea examenului fizic* (evidenţierea şi înregistrarea tuturor anomaliilor minore) precum şi de *identificarea secvenţelor* şi a *defectelor de câmp de dezvoltare* – care deşi se prezintă sub forma unor anomalii multiple reprezintă, din punct de vedere patogenic, defecte unice (vezi capitolul 14).

Secvenţa reprezintă o singură anomalie iniţială care determină secundar alte anomalii (de exemplu, în secvenţa Robin, hipoplazia mandibulei determină secundar despicătură palatină şi glosoptoză). Defectul de câmp de dezvoltare se produce prin afectarea (de către cauze diferite) a unei singure unităţi embrionare („câmp") din care rezultă structuri diferite, dar vecine (exemplu spectrul de anomalii al holoprozencefaliei); mulţi autori consideră că *secvenţele* şi *defectele de câmp embrionar* reprezintă în fond acelaşi lucru.

Tabelul 9.3. Categorii de anomalii congenitale

Categorie	Subcategorie	Definiţie	Exemple
Defecte izolate			
Variante normale		Prezente la >4% din populaţie	Pete mongoliene
Anomalii		Deviaţii de structură, formă şi/sau funcţie care sunt considerate anormale	
	Anomalii majore	Anomalii cu consecinţe medicale, chirurgicale sau cosmetice	Despicătură palatină
	Anomalii minore	Efect minim asupra sănătăţii individului; utile în diagnostic	Urechi jos plasate
	Malformaţii	Defecte morfologice produse printr-un proces primar şi intrinsec de dezvoltare anormală	Aplazie radială
	Displazii	Organizarea anormală a celulelor în ţesuturi	Hemangioame
	Disrupţii	Distrugerea extrinsecă a unei structuri normal formate	Bride amniotice
	Deformaţii	Formă sau poziţie anormală a unei părţi a corpului produsă prin forţe mecanice	Picior strâmb
	Secvenţe	O combinaţie de anomalii ce derivă dintr-o singură anomalie iniţială sau este produsă de factori mecanici	Secvenţa malformativă Pierre Robin Secvenţa deformativă Potter
	Defecte de câmp de dezvoltare	O unitate de morfogeneză (un set de primordii embrionare) ce reacţionează identic la cauze diferite, producând mai multe anomalii.	Spectrum holoprosencefalie
Defecte multiple	Sindrom	Anomalii multiple considerate a fi etiopatogenic corelate şi care nu reprezintă o secvenţă	Sindrom Down Sindrom Marfan Sindrom Zellwegwer
	Asociaţie	Întâlnirea neîntâmplătoare la unul sau mai mulţi indivizi a mai multor malformaţii ce nu sunt identificate ca fiind o secvenţă sau un sindrom	Asociaţia VA(C)TER(L)

(2) Anomaliile congenitale izolate trebuie diferenţiate în *anomalii majore* şi *anomalii minore* (fără semnificaţie medicală sau cosmetică) iar acestea din urmă trebuie deosebite de *variantele familiale.* De precizat că :

- *anomaliile majore* nu sunt mai importante pentru diagnostic decât cele minore; ele sunt doar mai evidente şi mai grave, atrăgând mai rapid atenţia medicului;
- *anomaliile minore* (ce trebuie bine cunoscute şi căutate) pot semnala existenţa unei anomalii majore neidentificate şi pot constitui repere preţioase pentru diagnostic.

(3) **Anomaliile majore izolate** vor fi *clasificate patogenic* în anomalii primare (malformaţii şi displazii) sau secundare (disrupţii şi deformaţii):

- **anomaliile primare** sunt produse precoce (embriopatii) printr-un proces primar şi intrinsec de dezvoltare anormală: în primul caz al unor componente anatomice (ex.: *anencefalia, polidactilia, agenezia renală, ş.a.)* şi în al doilea caz al ţesuturilor din care sunt formate (ex.: *osteo-condro-dispalzii*);
- **anomaliile secundare** – se produc *tardiv* (fetopatii), pe structuri *normal formate*, care sunt deformate (ex. *piciorul strâmb*) sau distruse (ex.: *atrezia intestinală sau amputaţiile congenitale)*.

Includerea unei anomalii congenitale majore în una din cele patru categorii are valoare prognostică şi pentru stabilirea riscului de recurenţă. Dificultatea majoră este reprezentată de faptul că un anumit tip de anomalie poate fi produs prin mecanisme diferite şi poate fi heterogen cauzale (vezi capitolul 14).

(4) **Anomaliile congenitale multiple** (majore şi/sau minore) pun cele mai dificile probleme de diagnostic deoarece ele pot forma *sindroame specifice, asociaţii sau combinaţii întâmplătoare* de anomalii congenitale care individual sunt frecvente. Pentru a stabili un diagnostic de grup sau de tip sunt utile o serie de acţiuni „interpretative".

- Stabilirea *momentului ontogenetic de producere* (debutul) a anomaliilor prezente la pacient permite (printr-o serie de date anamnestice sau fizice) să deosebim *defectele prenatale* (prin erori de morfogeneză), de cele *perinatale sau postnatale.*
  - *Defectele prenatale* se pot produce fie în perioada de blastogeneză (2-4 săptămâni după fecundare) când afectează întregul embrion, producând malformaţii majore multiple (ex.: *VACTERL*) fie în primele 5-8 săptămâni, când afectează numai anumite organe – în funcţie de orarul lor embriologic – şi produc malformaţii majore izolate. După săptămâna 9, majoritatea regiunilor şi organelor s-au format, este alterată *reglarea fină* a edificării structurilor embrionare şi apar *anomalii minore.*
  - *Defectele perinatale* se produc spre sfârşitul sarcinii, în cursul travaliului/naşterii sau postpartum, prin *alterări hipoxice* care se însoţesc *secundar* de microcefalie, contracturi, deficienţe de creştere, hipertrichoză.
  - *Defectele postnatale* apar la un *copil născut normal conformat*, la o anumită perioadă după naştere, ca urmare a unor evenimente acute sau cronice care schimbă morfologia şi alterează progresiv statusul neurologic şi diferite organe (ex.: *mucopolizaharidozele*). De subliniat că în multe sindroame (mai ales displazice) unele componente definitorii pentru diagnostic apar *la perioade diferite de viată* (de ex.: *sdr. Bardet-Biedl, NF-1, sdr. Marfan)*
- Determinarea *distribuţiei anatomice* a anomaliilor multiple permite orientarea spre anumite diagnostice (de exemplu, sindroamele oto-palato-digital, velo-cardio-facial, oro-facio-digital etc) şi permite căutarea lor în bazele de date informatizate sau atlase.
- Identificarea unor *modificări clinice* ce pot evoca existenţa unor sindroame:
  - tulburări importante de creştere[6] (hipostatură, talie înaltă, obezitate precoce), cu debut prenatal şi/sau postnatal, proporţionate sau asimetrice;
  - întârziere în dezvoltarea psihomotorie sau retard mintal[10] asociată sau nu cu alte fenomene neurologice (spasticitate) sau psihice (autism);
  - hipotonie şi/sau contracturi (artrogripoză) de cauze neurologice (centrale sau periferice), musculare, poziţionale (prin oligohidramnios); *secvenţa de akinezie fetală* este relativ frecventă;
  - afectare scheletică, viscerală, senzorială, gonadală;
  - laxitatea (articulară, cutanată) sau reducerea (sclere albastre) a ţesutului conjunctiv.
- Stabilirea *relaţiilor etiopatogenice* dintre anomalii congenitale multiple şi încadrarea lor într-un sindrom sau asociaţie (vezi tabelul 9.3 şi capitolul 14).
  - Un *sindrom dismorfic* sau plurimalformativ este o combinaţie caracteristică de anomalii congenitale majore şi minore observate împreună, într-un mod predictibil, la mai mulţi pacienţi în familii diferite şi, uneori, în aceeaşi familie; ele au foarte probabil o cauză sau un mecanism comun de producere (pe această bază se deosebesc: sindroame cromosomice, necromosomice sau teratogene). Elementele componente sunt

[6] Tulburările de creştere şi dezvoltare au cauze multiple şi totdeauna se va evalua atent posibilitatea unui determinism socio-economic şi exogen (dobândit)

nespecifice (pot fi prezente şi în alte sindroame şi pot avea cauze diferite) şi rareori una din anomalii duce la diagnostic; combinaţia este unică şi nu părţile sale.

- *Asociaţiile* sunt combinaţii neîntâmplătoare ale mai multor malformaţii majore, care nu au o cauză comună evidentă care să ducă al un model predictibil; exemple: *VACTERL, CHARGE sau MURCS.* Spre deosebire de sindroame, asociaţiile nu includ anomalii minore şi prezintă o mare variabilitate clinică: diagnosticul se afirmă ori de câte ori găsim la un pacient cel puţin 2-3 din elementele componente.

(5) Incadrarea bolnavului într-o categorie diagnostică este rezultanta acţiunilor de analiză şi interpretare a datelor pacientului (vezi tabelul 9.3). Aşa cum am precizat, problemele sunt dificile în cazul unor anomalii multiple, deseori minore, asociate cu tulburări de creştere şi dezvoltare. Pentru a se ajunge la opţiuni adecvate de *diagnostic specific* se vor folosi *algoritmuri* (Caseta 9.1) şi *chei de diagnostic*, atlase de sindroame, precum şi bazele de date accesibile pe CD (POSSUM, LDDB) sau prin Internet (Orphanet, GeneClinic, OMIM).

Pe baza datelor şi cunoştinţelor dobândite se încadra cazul într-o anumită categorie, în funcţie de care se vor stabili testele genetice necesare:

- boală genetică, sindrom, asociaţie;
- sindrom malformativ, disruptiv, deformativ sau displazie;
- sindrom cromosomic, monogenic (Mendelian), poligenic, teratogen, de cauză necunoscută;
- subgrup particular de sindroame malformative caracterizat printr-un element major: sindroame cu hipostatură sau talie înaltă, sindroame cu obezitate, sindroame cu contracturi sau cu laxitate articulară, sindroame cu despicături palatine, etc, displazii scheletice

5.6 EXPLORĂRI (TESTE) GENETICE

O valoare deosebită pentru diagnosticul final o au, desigur, **testele genetice** – analize cromosomice (prin tehnici cu marcaj sau FISH), probe biochimice şi teste bazate pe studiul ADN. Acestea pot fi planificate după examenul fizic al pacientului sau mai bine după ce s-au adunat toate datele şi se stabilesc elementele ce pledează pentru o boală cromosomică, o boală metabolică sau o boală monogenică.

Ţinând cont de caracterul „decisiv" al acestor teste trebuie să subliniem că laboratoarele care le realizează trebuie să fie acreditate, să folosească tehnici standardizate şi să fie incluse într-un control extern de calitate.

Medicul consultant, care planifică şi solicită teste de laborator, în special genetice, trebuie:

- să cunoască bine *indicaţiile şi limitele* testelor; vom preciza că nu sunt teste pentru fiecare boală sau sindrom plurimalformativ (si în acest caz clinica este „suverană") precum şi faptul că fiecare metodă are limitele ei;
- să ştie ce *produs biologic* trebuie să recolteze, modalitatea de *obţinere şi stocare*, modul şi mijloacele de *trimitere* la laborator;
- să obţină un *consimţământ informat scris* al pacientului/părinţilor, în deosebi pentru testele pre-simptomatice (şi în special la copii) sau prenatale (vezi capitolul 20);
- să asigure *confidenţialitatea* rezultatelor şi utilizarea lor numai cu acordul persoanei.

5.7. FINALIZAREA CONSULTULUI GENETIC

La finalul etapelor descrise mai sus medicul genetician va trebui: (1) să formuleze un diagnostic specific şi un prognostic; (2) să întocmească un plan de urmărire/îngrijire a bolnavului (ce va include şi posibilităţile de recuperare, prevenirea complicaţiilor) şi (3) să stabilească riscul genetic de recurenţă, precum şi eventualele opţiuni reproductive ce ar putea evita acest risc.

CASETA 9.1 ALGORITM DE DIAGNOSTIC ÎN ANOMALIILE CONGENITALE MULTIPLE

(adaptat după Aase, 1992, Wilson, 2000)

1). **Pacientul are o anomalie structurală?**

- **NU** → *continuarea diagnosticului NON sindromologic !*
- **DA**

↓

2). Sunt prezente anomalii multiple?

- **NU** → anomalia izolată este majoră? **NU** → *liniştirea părinţilor !*
- **DA** **DA** → *terapie adecvată, sfat genetic (risc mic)*

↓

3). Toate anomaliile sunt minore?

- **DA** → se caută o malformaţie majoră ocultă → Afost găsită? **NU** →*linistirea părinţilor !*
- **NU** → **pacientul are ACM majore şi minore** ← **DA**

4). Sunt implicate mai multe ţesuturi?

- **DA** → se caută o displazie → *terapie adecvată, prognostic, sfat genetic*
- **NU**

↓

5) Este o anomalie distructivă ?

- **DA** → se caută etiologia teratogenă a disrupţiei → *Terapie, sfat genetic (risc mic)*
- **NU**

↓

6). Există o deformaţie a oaselor şi articulaţiilor?

- **DA** → **pacientul are o secvenţă sau un sindrom cu deformaţii** →
  → A fost raportat oligohidramnios?
  - **NU** → au existat alte cauze de compresie intrauterină?
    - **DA** → Urmărire, sfat reproductiv, prognostic bun şi risc de recurenţă mic
    - **NU** → este prezentă hipotonia?
      - **DA** → posibil o **artrogripoză neurologică sau miopatică** → consult neurologic
      - **NU** ↓
  - **DA** → există o anomalie reno-urinară?
    - **DA** → posibil o **secvenţă deformativă idiopatică** → linistirea părinţilor, recuperare, urmărire.
    - **NU** → terapie de sprijin, sfat genetic.
- **NU** → **pacientul are malformaţii multiple ± deformaţii / disrupţii**

↓

7). Una din malformaţiile primare produce secundar alte anomalii (secvenţă)?

- **DA** → posibil **o secvenţă malformativă** → terpie adecvată, prognostic bun, sfat genetic
- **NU**

↓

8). A fost recunoscut un sindrom dismorfic?

- **DA** → ± confirmare de laborator → terapie adecvată, prognostic, sfat genetic
- **NU**

↓

9). Analiza literaturii sau bazelor de date informatizate; se stabilesc 1-3 semne / anomalii „cardinale" (deobicei mai rare, ce pot fi definite mai specific) ce vor constitui „puncte de intrare".

↓

10). A fost recunoscut un sindrom dismorfic?

- **DA** → ± confirmare de laborator → terapie adecvată, prognostic, sfat genetic
- **NU** → **sfatul altor specialişti**

Reevaluare periodică a pacientului.

Acurateţea şi precizia unui **diagnostic clinic şi etiologic** sunt esenţiale deoarece acesta nu este numai *„o sentinţă pentru o viaţă”* ci şi un element care influenţează hotărâtor o serie de decizii:

- *identificarea unor malformaţii oculte*, neevidente la evaluarea iniţială; un diagnostic corect implică o căutare atentă a unor malformaţii viscerale asociate sindromului (de ex.: anomaliile renale în sindromul Turner sau sindromul velo-cardio-facial).
- *prognosticul,*
- *alegerea unor opţiuni terapeutice*, chirurgicale (dacă sunt posibile) sau medicale (ex.: extirparea gonadelor în sindromul Turner sau în disgenezia gonadică mixtă, când există o linie XY, sau corectarea hipoglicemiei în sindromul Beckwith-Wiedemann pentru a preveni convulsiile şi alterarea creierului);
- *urmărirea atentă a pacientului* pentru evitarea unor complicaţii (ex.: evaluarea periodică ecocardiografică a diametrului inelului aortic la pacienţi cu sindrom Marfan);
- *sfatul genetic* şi riscul de recurenţă în familie,
- opţiunile reproductive, inclusiv diagnosticul prenatal.

Nu în ultimul rând, un diagnostic specific este benefic pentru liniştea pacienţilor şi/sau familiei (care va înţelege şi accepta mai uşor „handicapul genetic” şi va dezvolta o atitudine realistă şi pozitivă).

În fiecare caz şi mai ales în sindroamele plurimalformative:

- *se va valida diagnosticul* comparând din nou datele bolnavului cu cele din literatură / bazele de date de specialitate (ambele obligatorii în dotarea unui dismorfolog), existând obligaţia de identificare mai întâi a prezenţei caracterelor mai frecvente din sindrom şi apoi a celor mai evidente (de exemplu: în sindromul Waardenburg: distopia cantusului intern *vs* meşă albă frontală).
- se va stabili *gradul de certitudine a diagnosticului* : 100% - cert, 99 – 80 % - probabil, 79 – 50 % - posibil, sub 49 % - imprecis; acest lucru este important deoarece diagnosticul va influenţa toate activităţile viitoare: teste, management, sfat genetic;

Cu toate eforturile specialiştilor, într-o proporţie variabilă de cazuri (30-50%) nu se poate formula un diagnostic specific. Situaţia este delicată pentru medic şi trebuie explicată clar şi onest pacientului/familiei, oferindu-le două soluţii:

- consultarea altor specialişti cărora să le fie trimis dosarul clinic şi fotografiile pacientului;
- urmărirea şi evaluarea la anumite intervale de timp; simptomatologia unor boli sau sindroame (cu expresivitate variabilă) se poate completa în timp.

Responsabilităţile medicului nu se încheie o dată cu finalizarea unui diagnostic. O acţiune la fel de importantă sau, poate, mai importantă pentru părinţii unui copil afectat de o boală genetică sau un sindrom malformativ– este stabilirea unui **plan de îngrijire** a pacientului (inclusiv de educaţie) bazat pe manifestările bolii, ce trebuie influenţate pozitiv, precum şi pe evoluţia ei (istoricul natural), pentru prevenirea unor complicaţii şi stabilirea unor acţiuni în favoarea pacientului. Fiecare sindrom are o listă de complicaţii potenţiale care formează baza unor ghiduri de management preventiv. Astfel de ghiduri „standardizate” sunt disponibile astăzi pentru cele mai frecvente boli şi sindroame (vezi Cassidy şi Allanson – „Management of genetic syndromes”, 1999).

O atenţie specială şi permanentă se va acorda **sprijinului psihologic şi social** al familiei, prin intervenţia unor asistenţi sociali, grupuri de sprijin (asociaţii ale părinţilor copiilor bolnavi).

Ultima acţiune va fi **calcularea riscului de recurenţă** – în funcţie de boală, datele familiale, etc – şi identificarea, pe arborele genealogic, a persoanelor cu risc genetic crescut din familie, în vederea unui sfat genetic.

O dată încheiate aceste activităţi se va ordona şi verifica **dosarul clinic** al pacientului, care va cuprinde: fişa de consult genetic (standard), arborele genealogic, fotografiile pacientului, sinteze ale altor evaluări clinice, buletine de analize de laborator, de radiologie sau anatomo-patologice, sinteza[7] cazului (epicriza), date medicale despre alţi membri ai

[7] Sinteza de caz este nu numai foarte utilă ci şi obligatorie; se va folosi metoda clasică, învăţată în Facultate şi denumită, în literatura engleză, **SOAP** în care **S** – înseamnă date subiective furnizate de conasultand, **O** –

familiei, formele (semnate) de consimţământ pentru teste genetice/solicitări de informaţii medicale etc, copii ale scrisorilor către pacient/familie şi către medicul de familie care trimite cazul. Importanţa medicală, etică şi legală a acestei documentaţii nu mai trebuie discutată dar vom preciza că ignorarea obligaţiei sau „amânarea" ei din lipsa de timp (mai ales redactarea sintezei de caz/epicrizei şi scrisorilor cu concluzii şi recomandări către pacientul /familia consultat(ă) şi medicul ce a trimis cazul) poate avea consecinţe negative.

5.8. COMUNICAREA CONCLUZIILOR.

Această etapă se adresează pacientului/consultandului şi/sau părinţilor săi precum şi medicului de familie sau celui care a trimis cazul. În primul caz, întrevederea trebuie atent pregătită, revizuind datele, identificând problemele dificile şi stabilind „un plan" de prezentare, care va include: diagnosticul de boală, caracteristicile bolii, istoria ei naturală, posibilităţile de recuperare şi îngrijire, ereditatea şi riscul de recurenţă, opţiunile reproductive, ş.a. De multe ori o singură „şedinţă" este insuficientă şi ineficientă; de aceea comunicarea verbală se va însoţi de o comunicare scrisă, materiale educaţionale şi invitaţia la alte discuţii, cu medicul consultant sau cu un personal auxiliar („nurse" de genetică, asistenţi sociali, psihologi) cu experienţă în domeniu.

Informaţiile transmise trebuie să fie precise, clare, cuprinzătoare, adaptate nivelului de înţelegere şi percepţie ale consultanzilor, precum şi statusului lor cultural (religie, credinţe). Trebuie respectate autonomia, confidenţialitatea şi, în cazul sfatului genetic, caracterul non-direcţional. O problemă delicată este comunicarea unor date altor membri ai familiei care, prin natura genetică a bolii, pot avea un risc crescut de a face sau transmite boala. Consultandul trebuie încurajat să facă el acest lucru sau să fie de acord (în scris) cu abordarea lor de către medicul genetician.

5.9. URMĂRIREA EVOLUŢIEI PACIENŢILOR

Urmărirea efectivă şi eficientă pe termen lung a pacienţilor şi familiei este o acţiune necesară în toate cazurile dar mai ales atunci când diagnosticul trebuie confirmat sau stabilit. Sfaturile şi îngrijirile acordate pacienţilor vor fi diferite la vârste diferite; cunoştinţele despre bolile genetice evoluează progresiv şi pot apărea noi teste sau posibilităţi de diagnostic; urmărirea în timp poate facilita profilaxia complicaţiilor posibile.

5.10 CONTACTAREA RUDELOR CU RISC GENETIC CRESCUT

Pe baza datelor familiale, cu acordul consultanzilor şi sprijinul medicilor de familie rudele apropiate cu risc genetic vor fi evaluate (dacă acceptă acest lucru) pentru a se stabili dacă sunt sau nu purtători sănătoşi de mutaţie. Acest diagnostic presimptomatic este important mai ales pentru bolile (autosomal dominante) care debutează clinic după 30-40 de ani.

* * *

Indiscutabil, consultul şi sfatul genetic sunt acţiuni complexe, dificil de realizat, ce necesită cunoştinţe, aptitudini şi atitudini dar şi mult timp. Importanţa lor decisivă pentru cursul vieţii pacientului şi familiei sale este o motivaţie puternică pentru un profesionalism desăvârşit.

B. EXPLORĂRILE GENETICE

1. DIAGNOSTICUL CROMOSOMIC

Analiza cromosomică reprezintă o metodă valoroasă de diagnostic în multiple situaţii clinice, prenatal sau postnatal. Medicul practician trebuie să cunoască indicaţiile şi limitele

---

reprezintă datele obiective identificate de medic; **A** (de la *„assessment"*- apreciere, evaluare) – conţine succint concluziile diagnostice; **P** – planul recomandărilor terapeutice şi acţiunilor viitoare.

metodelor citogenetice, modul de recoltare, procesare şi trimitere la laborator a probelor utilizate pentru aceste teste, precum şi interpretarea rezultatelor obţinute de către laborator. În capitolul 2.D au fost prezentate datele relevante privind morfologia şi studiul cromosomilor umani iar în capitolul 6.C s-au discutat anomaliile cromosomice şi consecinţele lor fenotipice. Aceste noţiuni sunt absolut necesare diagnosticului bolilor cromosomice (capitolul 10). În această secţiune ne vom referi la **indicaţiile practice ale examenelor citogenetice**.

1.1 TESTUL CROMATINEI SEXUALE

Cromatina sexuală ne oferă informaţii privind *numărul cromosomilor sexuali* şi, prin aceasta, date preţioase pentru stabilirea sexului genetic (XX sau XY) precum şi a anomaliilor numerice (aneuploidiilor) gonosomice.

- Cromatina X rezultă prin inactivarea unui cromosom X la femeia XX, care prin heterocromatinizare va forma corpusculul Barr vizibil în nucleul interfazic (vezi capitolul 2.D.2.2). Numărul corpusculilor Barr este egal cu suma cromosomilor X minus 1; testul Barr va fi deci pozitiv la femeia normală şi negativ la bărbatul normal.
- Cromatina Y reprezintă heterocromatina din cele 2/3 distale ale braţului lung al cromosomului Y, vizibilă la microsocopul în fluorescenţă sub forma corpusculului F; numărul de corpusculi F este, firesc, egal cu numărul cromosomilor Y.

Testul cromatinei sexuale este simplu, ieftin şi util în practică, în situaţii clinice bine definite. Un test anormal reprezintă o opţiune foarte serioasă pentru diagnostic, mai ales într-un context clinic sugestiv. Totuşi, trebuie precizat că diagnosticul final va fi pus numai prin analiza cromosomică.

În practica curentă se foloseşte mai ales determinarea cromatinei X (testul Barr), realizată cu o metodă standardizată şi o interpretare atentă şi corectă. Un rezultat anormal (test Barr negativ la persoane feminine, test Barr pozitiv la persoane masculine sau prezenţa a doi corpusculi Barr) va fi confirmat prin repetarea testului şi o evaluare independentă de către un alt examinator. O problemă delicată apare în cazul rezultatelor cert pozitive dar cu un procent mic de celule cromatin-X pozitive (sub 10-12 %); dacă se exclude un viciu tehnic şi rezultatul persistă este necesară analiza cromosomică. O altă problemă delicată, dar mult mai rar întâlnită, este prezenţa unui corpuscul Barr de dimensiuni anormale, mai mic sau mai mare de 1,5 microni, care poate reflecta o anomalie de structură a cromosomului X: o deleţie de X sau un isocromosom X. Testul cromatinei Y se foloseşte mult mai rar, fiind şi mai laborios şi necesitând o echipare cu microscopie în UV. În prezent, în laboratoarele modern utilate, se foloseşte metoda FISH interfazic cu sonde pentru X şi Y, care pune un diagnostic de certitudine, fără a fi necesară deobicei efectuarea cariotipului.

Testul cromatinei X se recomandă, în prezent, în două situaţii frecvente:

- o anomalie a organelor genitale externe (hipospadias ± testiculi necoborâţi congenital, micropenis etc) sau o stare intersexuală evidentă; cromatina sexuală va permite stabilirea sexului genetic şi încadrarea diagnostică a cazului.
- semne clinice care ar putea evoca fenotipul unor anomalii ale cromosomilor sexuali (în special 45,X sau 47,XXY) sau ale unor disgenezii gonadice:
  - la fete: hipostatură proporţionată, gât scurt ± palmat, limfedem pe faţa dorsală a picioarelor sau/şi mâinilor; pubertate întârziată, caractere sexuale secundare reduse, amenoree primară sau secundară precoce;
  - la băieţi: talie înaltă, pe seama membrelor inferioare; caractere sexuale secundare reduse; ginecomastie, testiculi mici.

Limitele testului cromatinei sexuale sunt reprezentate de caracterul echivoc al testului (spre exemplu un test Barr negativ la o persoană de sex feminin poate semnala fie un sindrom Turner – 45,X, fie un sindrom Morris – 46,XY, fie o disgenezie gonadică mixtă – 46,XY/45,X) şi necesitatea efectuării cariotipului pentru a avea un diagnostic citogenetic cert.

1.2 ANALIZA CROMOSOMILOR UMANI

Studiul cromosomilor se efectuează postnatal – pentru diagnosticul anomaliilor constituţionale sau dobândite (în unele neoplazii sau după expunerea la agenţi clastogeni, ce rup cromosomii) şi prenatal – pe celule fetale recoltate din placentă (vilozităţi coriale, la 10-11 săptămâni de sarcină) sau lichid amniotic (15-16 săptămâni de sarcină), sub control ecografic. Metodele actuale de studiu (vezi capitolul 2.D) se bazează deobicei pe culturi de celule şi marcaj cromosomic în metafază (300-400 de benzi); în funcţie de datele clinice (când se suspectează un sindrom cu microdeleţie sau duplicaţie) şi/sau rezultatele metodelor standard se recurge la tehnici sofisticate de generaţia a III-a (analiza cromosomilor în pro-metafază, cu 550-850 benzi) sau de generaţia a IV-a (FISH).

Analiza cromosomilor este o metodă complexă (necesită un laborator special utilat) şi scumpă dar relaţia cost-beneficiu este excelentă deoarece se pune un diagnostic precis, pentru o viaţă (de regulă nu este nevoie repetarea analizei). Totuşi medicii practicieni trebuie să cunoască indicaţiile metodelor de analiză cromosomică pentru o selecţie corectă a cazurilor.

Ţinând cont de consecinţele fenotipice şi reproductive ale anomaliilor cromosomice (vezi capitolul 6.C) studiul cromosomilor este indicat în următoarele situaţii:

(1) La copiii cu anomalii congenitale multiple (minore ± majore) mai ales dacă se însoţesc de tulburări de creştere prenatală şi/sau întârziere în dezvoltarea psiho-motorie postnatală sau dacă anamneza familială evidenţiază cazuri de avorturi spontane/nou-născuţi morţi/ nou-născuţi vii plurimalformaţi. Efectuarea cariotipului se va face obligatoriu chiar şi în situaţiile în care aspectul clinic este caracteristic pentru un diagnostic de boală cromosomică (în special sindrom Down), pentru a stabili exact genotipul pacientului.

(2) În debilităţi mintale (indiferent de grad) de cauze nedeterminate (se exclud deci cazurile de suferinţă fetală, meningo-encefalite postnatale, boli metabolice) şi/sau tulburări de comportament - mai ales dacă se însoţesc de dismorfie facială şi/sau anamneză familială pozitivă. La subiecţii de sex masculin se va face cariotipul standard cu marcaj precum şi teste pentru evidenţierea cromosomului X fragil.

(3) La cuplurile cu tulburări de reproducere (≥2 avorturi spontane şi/sau nou-născuţi morţi/vii plurimalformaţi) pentru a se evidenţia o posibilă anomalie cromosomică echilibrată la unul dintre parteneri (5-10% din cazuri).

(4) Dacă în situaţiile (1) şi (2) se identifică o anomalie de structură neechilibrată (ce produce o monosomie sau trisomie parţială) se va studia cariotipul părinţilor pentru a se căuta prezenţa unei eventuale anomalii cromosomice echilibrate. Dacă aceasta se confirmă se va recomanda analiza cromosomică la rudele de gradul 1, care ar putea moşteni anomalia echilibrată.

(5) La persoanele cu stări intersexuale, pentru stabilirea sexului genetic (XX sau XY) sau evidenţierea unor anomalii ale cromosomilor sexuali.

(6) În tulburările de dezvoltare pubertară sau în prezenţa unor semne de disgenezie gonadică), mai ales dacă la băieţi se adaugă anomalii ale OGE, ginecomastie sau o spermogramă anormală (azoo- sau oligospermie) sau dacă la fete se asociază amenoree primară (absenţa menarhei) sau amenoree secundară precoce.

(7) În hemopatiile maligne, mai rar în tumorile solide, pentru diagnostic pozitiv şi diferenţial, prognostic sau urmărirea evoluţiei tratamentului.

(8) În cazurile rare de sindroame cu instabilitate cromosomică (sindromul Bloom, anemia Fanconi, sindromul Nijmegen, sindromul ICF, sindromul Roberts Ataxia-telangiectazia) (vezi capitolul 6.C.1.5).

(9) Pentru depistarea efectului mutagen al expunerii profesionale sau accidentale la radiaţii ionizante şi unele substanţe chimice (clastogene).

(10) În diagnosticul prenatal, studiul cromosomilor în celulele fetale este indicat la femeile gravide:

a) peste 35-38 de ani;

b) atunci când unul din părinţi are o anomalie cromosomică echilibrată;

c) atunci când cuplul a avut un copil cu o anomalie cromosomică *de novo* (deci cariotipul părinţilor este normal) şi uneori poate avea un risc crescut pentru un alt copil cu anomalie cromosomică (de exemplu, mozaicism gonadic parental);

d) pentru stabilirea sexului genetic, în cazul bolilor recesive gonosomale (în care se îmbolnăvesc numai ½ din băieţi), mai ales atunci când nu există o metodă de diagnostic prenatal specific pentru afecţiunea respectivă.

e) atunci când se identifică semne ecografice de alarmă (vezi capitolul 18) sau testele de screening biochimic (triplu test) pentru sindromul Down sunt pozitive (vezi capitolul 10)

Limitele metodelor de analiză cromosomică sunt determinate de rezoluţia lor, care nu permite evidenţierea mutaţiilor genice sau poligenice. Subliniem din nou necesitatea unui laborator de citogenetică bine echipat, cu personal calificat, tehnici standardizate şi control intern şi extern de calitate.

2. DIAGNOSTICUL MOLECULAR

2.1. DEFINIŢIE.

Orice boală este definită ca entitate morbidă pe baza mai multor elemente: cauza (*etiologie*), mecanismul de producere (*patogenie*) – care determină manifestările clinice – tabloul clinic şi paraclinic (fenotipul) specific. Cu cât aceste elemente sunt mai bine definite, cu atât diagnosticul este mai precis, iar strategiile terapeutice şi preventive sunt mai clar direcţionate.

În medicina clasică, procesul diagnostic este bazat pe identificarea unui tablou clinic şi pe analiza *in vitro* a celulelor sau ţesuturilor modificate, a căilor biochimice alterate sau a unor agenţi infecţioşi cauzali. Cu toate că această *analiză fenotipică* a fost constant îmbunătăţită în decursul timpului prin aplicarea unor tehnici şi metode noi (ca microscopia, spectrometria, enzimologia sau imunohistochimia, ş.a.), multe boli nu au putut fi complet definite din punct de vedere etiopatogenic până la dezvoltarea metodelor de analiză genotipică, a ADN sau ARN.

Conceptul de **diagnostic molecular** se referă la noile tehnologii de diagnostic care au drept obiect (ţintă) de studiu ADN-ul şi ARN-ul celular, urmărind identificarea mutaţiilor şi polimorfismelor genice implicate în producerea bolilor, identificarea unor genomuri exogene patogene (în unele boli infecţioase) precum şi identificarea precisă a persoanelor („tiparea genetică" – DNA fingerprinting). În această secţiune vor fi prezentate doar principiile de bază ale unor metode de diagnostic molecular şi vor fi aduse unele exemple sugestive. O listă completă şi actualizată permanent a metodelor de diagnostic molecular al bolilor genetice se poate găsi pe site-ul GeneTests – GeneClinics la adresa de web http://www.geneclinics.org.

Obiectivele diagnosticului molecular al bolilor genetice sunt:

- diagnosticul genotipic postnatal sau chiar prenatal al bolnavilor cu afecţiuni monogenice
- diagnosticul presimptomatic al purtătorilor de gene dominante cu manifestare tardivă;
- identificarea purtătorilor sănătoşi (heterozigoţi) de gene recesive;
- identificarea persoanelor purtătoare de premutaţii (pentru afecţiunile determinate de mutaţii dinamice);
- identificarea unor mutaţii genice sau rearanjarii cromosomice în vederea stabilirii stadiului sau a evaluării prognosticului unor tumori sau hemopatii maligne.

În funcţie de nivelul cunoştinţelor referitoare la substratul genetic al afecţiunii şi la numărul şi frecvenţa populaţională a mutaţiilor, se disting două categorii de *metode de diagnostic molecular*:

- **Metodele directe** – aplicabile atunci când gena şi/sau mutaţia sunt cunoscute - urmăresc evidenţierea unei mutaţii la nivelul genotipului unui individ. Specimene (ADN, ARN) provenite de la consultand sunt testate pentru identificarea unui anumit tip de mutaţie; testul este individual şi furnizează informaţii doar despre respectivul individ.

- **Metodele indirecte** – aplicabile atunci când gena nu a fost secvenţiată sau este greu accesibilă diagnosticului direct - urmăresc transmiterea intrafamilială a unor markeri genetici înlănţuiţi cu locusul morbid, pentru a descoperi dacă consultandul a "moştenit" sau nu alela mutantă de la un părinte heterozigot; testul vizează o familie şi furnizează informaţii referitoare la segregarea unui anumit segment cromosomic în această familie.

2.2 TEHNICI DE BAZĂ ALE DIAGNOSTICULUI MOLECULAR

a. Izolarea ADN genomic

Diagnosticul molecular la nivel de ADN presupune ca prim timp izolarea ADN genomic (nuclear sau mitocondrial) de calitate (puritate şi integritate corespunzatoare, dimensiuni ale fragmentelor mai mari de 150 kb) din ţesuturi sau culturi de celule. Cel mai frecvent se utilizează sângele venos. Metodele de izolare utilizate în prezent se caracterizează prin gradul lor înalt de stringenţă necesar înlăturării proteinelor (cu ajutorul unor detergenţi şi proteinazei K), lipidelor (prin extracţia fenol-cloroform), ARN-ului (prin tratare cu RN-ază) sau a altor constituenţi celulari care ar putea interfera cu activitatea enzimelor de restricţie, a ligazelor sau a polimerazei. Sunt, de asemenea, esenţiale eliminarea oricăror nucleaze care pot degrada ADN-ul de greutate moleculară mare, precum şi evitarea stresului mecanic care poate duce la fragmentarea ADN-ului genomic în cursul purificării.

b. Sectionarea cu enzime de restricţie

Pentru obţinerea unor fragmente de ADN (ce conţin o genă sau o parte din genă) în vederea amplificării şi analizei ulterioare se folosesc *enzime de restricţie* (vezi capitolul 3.C.1.1). Enzimele de restricţie nu secţionează ADN la întâmplare ci au un grad înalt de specificitate: ele "scanează" ADN şi se opresc atunci când recunosc o secvenţă nucleotidică specifică, numită *situs de restricţie*, la nivelul căreia secţionează ADN.

Clivarea moleculei de ADN cu o anumită enzimă de restricţie "fragmentează" ADN într-un *număr definit, caracteristic şi reproductibil de fragmente*, care reflectă localizarea şi frecvenţa situsurilor specifice de clivare sau *harta de restricţie*. Situsurile de restricţie sunt dispuse la distanţe variate iar fragmentele produse prin secţionare sunt inegale; pe această bază, ele pot fi uşor separate prin electroforeză în gel. Diferite mutaţii pot modifica situsul de restricţie (care nu va mai fi cunoscut de enzimă) sau pot crea situsuri noi. De aceea clivarea ADN unor persoane diferite din populaţie cu aceiaşi enzimă de restricţie va produce fragmente de ADN cu lungimi diferite. Se realizează un amplu fenomen de *"polimorfism al lungimii fragmentelor de restricţie"* (RFLP), care poate fi folosit ca un marker genetic preţios în diagnosticul unor boli genetice. Hărţile de restricţie permit compararea moleculelor de ADN de la diferiţi indivizi, fără a fi necesară determinarea în detaliu a secvenţei nucleotidice.

c. Separarea fragmentelor de ADN prin electroforeză în gel

Datorită prezenţei grupurilor fosfat, încărcate negativ, în prezenţa unui câmp electric, fragmentele de ADN vor migra spre anod. Rata migrarii este determinată de frecare, astfel că moleculele mai mari străbat cu mai multă dificultate porii, deplasându-se mai lent decât moleculele mici. Gelul acţionează ca o sită cu pori prin care trebuie să treacă moleculele de ADN. Odată cu eşantioanele de ADN se pun să migrează “markeri ADN” cu o mărime cunoscută; ei oferă posibilitatea calcularii lungimii moleculelor din eşantion.

Pentru vizualizarea directă a moleculelor de ADN se utilizează bromura de etidiu, inclusă în gel. Acest colorant se intercalează între bazele ADN-ului dublu catenar şi are o fluorescenţă roşu-oranj când este iradiat cu lumină ultravioletă (260-360nm). Colorantul neintercalat nu este fluorescent; ca atare numai benzile de ADN din gelul de agaroză vor fi vizualizate în lumină ultravioletă.

Există trei tehnici de electroforeză în gel care fac posibilă separarea şi vizualizarea unor fragmente de ADN cu lungimi cuprinse între 5 nucleotide şi 5.000.000 de nucleotide.

- *Electroforeza în gel de agaroză* – permite separarea unor fragmente de ADN cuprinse între 0,1-20 kb.
- *Electroforeza în gel de poliacrilamidă* este similară celei în gel de agaroză, dar discriminarea fragmentelor se realizează în funcţie de mărimea porilor. Gelurile de 3,5% poliacrilamidă pot separa fragmente de cuprinse între 1.000-2.000 Kb iar gelurile de 20% acrilamidă fragmente de 6-100 nucleotide; rezoluţia fragmentelor este foarte bună, aceste geluri fiind folosite şi pentru secvenţierea ADN.

- *Electroforeza în câmp electric pulsatil* face posibilă separarea unor fragmente mari de ADN, de până la 5 Mb, prin schimbarea (alternarea) direcţiei câmpului electric.

d. Amplificarea in vitro a secvenţelor de ADN (Polymerase Chain Reaction)

Reacţia de polimerizare în lanţ (PCR, "polymerase chain reaction") permite amplificarea enzimatică aproape exponenţială a ADN-ului pornind de la cantităţi foarte mici de material, mimând mecanismul de bază al replicării ADN. Principiul metodei PCR a fost prezentat în capitolul 3.C.2. şi figura 3.20. Avantajele clonării acelulare a ADN prin PCR sunt determinate în primul rând de *simplitatea* sa (nu necesită nici o altă manipulare, în afara variaţiilor termice necesare diferitelor etape ale reacţiei, şi deaceea se pretează la automatizare, folosind un *termociclor*); în al doilea rând, PCR este o metodă *rapidă, sensibilă, eficace şi ieftină*.

Metoda PCR a fost aplicată cu succes la studiul diverselor tipuri de secvenţe de ADN: genomic, mitocondrial, exogen (în special viral), precum şi la molecule de ARNm, după ce în prealabil s-a obţinut cu ajutorul transcriptazei inverse o moleculă de ADN complementar unui mesager (RT-PCR sau reverse *transcriptase PCR*). Tehnica PCR a revoluţionat atât analiza genetică, cât şi diagnosticul molecular al bolilor genetice, prin detecţia directă a mutaţiilor sau diagnosticul indirect prin polimorfismul RFLP sau al markerilor minisatelitici. In acest scop s-au elaborat numeroase variante ale PCR.

d. Secvenţierea ADN

Etapa principală de analiză genotipică este *determinarea secvenţei nucleotidice*, deci a informaţiei genetice a unui fragment de ADN (genă). Această acţiune este decisivă pentru a stabili *structura* genei precum şi secvenţa de aminoacizi a *proteinei* codificată de genă (în cazul în care ea nu a fost identificată). In viitor, cunoaşterea genomului uman şi perfecţionarea unor sisteme automate vor da posibilitatea diagnosticării bolilor genetice direct prin secvenţiere.

Secventierea ADN este o versiune modificată a replicării ADN, realizata în condiţii controlate *in vitro*. Principiul metodei a fost descris în capitolul 3.C.3.2. Vom menţiona doar că secvenţierea diferă de replicarea normală prin faptul ca in mediul de reactie sunt incluse a didezoxinucleotidele (ddNTP), cărora le lipseşte grupul 3'-OH necesar pentru extensia lanţului de către ADN polimerază. În momentul încorporării unui ddNTP în ADN, polimerizarea se încheie şi, de aceea, metoda este denumită **secvenţiere prin încheierea lanţului** ("chain termination sequencing"). Produsii reacţiei pot fi detectati prin încorporarea în mediul de incubatie (în amorse sau în nucleotide) a unor markeri (marcaţi fluorescent diferit pentru fiecare tip de nucleotid), urmată de electroforeza în gel de poliacrilamidă pentru separarea perfectă a fragmentelor (figura 9.6).

e. Hibridizarea acizilor nucleici

Detecţia şi identificarea unor secvenţe specifice de acid nucleic constituie o procedură de rutină în biologia moleculară. O astfel de metodă se bazează pe faptul că, în condiţii favorabile, *două molecule monocatenare de acizi nucleici pot forma o moleculă hibrid, în funcţie de gradul de complementaritate a secvenţelor lor nucleotidice*. Formarea duplexului se realizează în principal prin legături de hidrogen între guanozină şi citozină, şi respectiv între adenozină şi timidină (sau uridina, în cazul ARN-ului). Astfel, hibridizarea moleculară asociată cu o metodă de marcare şi detecţie devine foarte utilă pentru identificarea unor secvenţe identice (sau înrudite) cu ajutorul unei secvenţe nucleotidice de referinţă (sondă / probă) (vezi capitolul 3.C.3.1).

(1) Analiza ADN genomic prin metoda de transfer Southern.

Southern blotting reprezintă o metodă de stabilire a prezenţei / absenţei unei anumite secvenţe de ADN în ADN-ul genomic, cu ajutorul unei secvenţe ADN complementare (sondă /probă ADN).

Întrucât ADN-ul genomic este de dimensiuni foarte mari, el este tăiat cu una sau mai multe enzime de restricţie, după care fragmentele sunt separate în funcţie de mărime prin electroforeză în gel (de obicei, de agaroză). Moleculele migrate în gel sunt denaturate în molecule monocatenare prin tratament cu alcali, apoi neutralizate şi transferate prin capilaritate pe o membrană de hibridizare ("blotting"), utilizând o soluţie ionică concentrată. ADN-ul este legat ireversibil la membrană prin intermediul unor legături încrucişate (cross-linking) sub acţiunea luminii ultraviolete. Astfel, molecula ţintă monocatenară este disponibilă pentru hibridizarea (asocierea pe baza complementarităţii bazelor) cu o

probă marcată (radioactiv sau fluorescent) de ADN monocatenar. După înlăturarea hibridizării nespecifice prin spălare cu detergenţi (SDS) şi soluţii ionice concentrate, interacţiunile specifice dintre ţintă şi probă (moleculele hibride) sunt detectate fie prin autoradiografie, fie prin metode de detecţie non-radioactive (vezi figura 3.21 şi figura 9.7).

De la introducerea sa în 1975 (Southern, 1975), analiza ADN prin Southern blotting a devenit o tehnică de rutină în analiza organizării genelor, identificarea şi clonarea unor secvenţe specifice, studiul mutanţilor, caracterizarea genotipurilor prin analiza polimorfismelor fragmentelor de restricţie (RFLPs – „restriction fragment length polymorphisms"), diagnosticul bolilor genetice şi al cancerului, detecţia prezenţei unor microorganisme în ţesuturile umane sau identificarea genetică ("genetic fingerprinting") în medicina legală.

(2). Analiza ARN prin Northern blot

Analiza ARN-ului prin Northern blot este o procedură esenţială pentru obţinerea de informaţii privind expresia genelor în organismele multicelulare, deoarece poate aprecia cantitatea unei secvenţe de ARN (de obicei ARNm) într-un anumit ţesut sau tip de celule. În diagnosticul mutaţiilor, această metodă poate releva prezenţa unor modificări în nivelul expresiei sau în mărimea moleculei de ARNm corespunzătoare unei anumite gene.

f. Analiza proteinelor prin metoda de transfer Western blotting

Această tehnică permite obţinerea de informaţii privind dimensiunea şi cantitatea proteinelor mutante extrase din probe tisulare de la pacienţi cu boli genetice (vezi figura 3.24).

2.3. METODE DIRECTE DE DIAGNOSTIC MOLECULAR

Metodele directe urmăresc evidenţierea unei mutaţii cunoscute în genotipul unui pacient; testul este individual şi furnizează informaţii doar despre respectivul pacient Există astăzi o multitudine de metode de analiză directă a ADN, fiecare cu indicaţii şi limte precise (tabelul 9.4).

Tabelul 9.4 Metode directe de diagnostic molecular

Metoda	Comentarii
Analiza RFLP (digestie enzimatică a ADN-ului amplificat prin PCR şi evaluarea mărimii fragmentelor prin electroforeză în gel şi Southern blot)	Numai pentru deleţii sau inserţii de dimensiuni mari sau mutaţii punctiforme în care mutaţia creează sau abolește un situs de restricţie natural sau unul introdus prin utilizarea unor primeri PCR speciali (PCR-based Southern)
Hibridizarea ADN-ului amplificat cu oligonucleotide specifice de alelă (ASO) pe dot-blot sau gene chip	Metodă generală pentru mutaţii punctiforme determinate; utilizarea unor seturi largi de oligonucleotide permite scanarea concomitentă pentru multiple mutaţii
PCR utilizând primeri cu specificitate de alelă (test ARMS)	Metodă generală pentru mutaţii punctiforme; design-ul amorselor este critic. Poate fi adaptat pentru tehnologia cipurilor.
Testul de ligare a oligonucleotidelor (OLA)	Metodă generală pentru mutaţii punctiforme determinate
PCR cu primeri situaţi de o parte şi de alta al unui punct de translocaţie, deleţie sau inserţie	Amplificarea reuşită indică prezenţa rearanjarii cromosomice căutate.
Secvenţierea	Permite detecţia şi caracterizarea completă a mutaţiei. Este necesară cunoaşterea secvenţei genomice a genei.

a. Analiza RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Analiza prezenţei şi mărimii fragmentelor de restricţie corespunzătoare secvenţei genomice a unei anumite gene permite evaluarea unor modificări (deleţii, inserţii) de dimensiuni mari (sute de pb) ale secvenţei nucleotidice la diferiţi pacienţi. În anumite boli genetice, mutaţia responsabilă anulează un situs de restricţie specific pentru o anumită enzimă, situat în interiorul genei. În această situaţie, analiza lungimii fragmentelor de restricţie generate de enzima în cauză va indica direct prezenţa sau absenţa mutaţiei. (figura 9.8).

b. Metoda ASO (allele specific oligonucleotides)

Mutaţiile punctiforme ale unei gene pot fi detectate cu ajutorul PCR, cu conditia cunoasterii secventei genice din vecinătatea mutaţiei. In acest caz, amorsele (*primeri*) utilizate sunt specifice (complementare) fie alelei normale (ASO-N), fie celei mutante (ASO-M), fiind

denumite *oligonucleotide cu specificitate de alelă*. (vezi capitolul 3.C.3.1.b) Cele două oligonucleotide diferă doar printr-o singură bază, dar acest fapt este suficient pentru ca hibridizarea oligonucleotidelor să fie specifică pentru o anumită alelă.

Când se realizează detecţia unei mutaţiei, specimenul de ADN este amplificat alături de 3 specimene cunoscute: homozigot normal (NN), heterozigot (Na) şi homozigot mutant (aa). Produsele PCR sunt transferate pe filtre de nitroceluloză ("dot blot") şi apoi sunt hibridizate (separat, în două reacţii) cu cele două oligonucleotide specifice, marcate radioactiv (cu ^{32}P). Hibridizarea se face în condiţii de stringenta inalta, pentru ca o diferenţă de o singură bază ("mismatch") să împiedice asocierea nespecifică (vezi figura 3.22).

Dacă un specimen de ADN este recunoscut de oligonucleotidul specific alelei mutante, înseamnă ca persoana este purtătoarea a cel puţin unei gene mutante. Diferenţierea între heterozigoţi şi homozigoţi mutanţi se realizează prin analiza filtrului cu oligonucleotidul normal, hibridizarea acestuia cu acelaşi specimen de ADN semnificând faptul că persoana este heterozigotă (figura 9.9) Trebuie subliniat faptul că acest test este specific unui anumit tip de mutaţie, iar *absenţa hibridizării cu oligonucleotidul specific alelei mutante nu înseamnă absenţa mutaţiilor ci doar absenţa mutaţiei particulare pentru care s-a făcut testarea.*

c. Metoda ARMS (amplification refractory mutation system)

Metoda ARMS este o metodă care permite în principiu detectarea oricărei mutaţii punctiforme printr-o tehnică tip PCR în care se utilizează amorse cu specificitate alelică.
Principiul este asemănător cu cel utilizat în ASO, numai că în acest caz nu se desemnează primeri care diferă între ei în porţiunea mijlocie a secvenţei (pentru a maximiza instabilitatea termodinamică a heteroduplexurilor) ci la nivelul extremităţii 3'. Atunci când primerul nu realizează o împerechere corectă a bazei 3' (există un mismatch), Taq polimeraza nu va putea declanşa reacţia de polimerizare. Utilizarea a două reacţii (una cu primerul corespunzător mutaţiei şi alta cu cel corespunzător alelei normale) permite genotiparea corectă atât a homozigoţilor cât şi a heterozigoţilor. Mai nou se utilizeaza aşa numita tehnică tetra-ARMS care permite genotiparea eficientă a polimorfismelor mononucleotidice într-o singură reacţie (figura 9.10).

2.4. METODE INDIRECTE DE DIAGNOSTIC MOLECULAR

Deşi secvenţierea genelor este metoda cea mai directă de identificare a mutaţiilor, mărimea genelor umane (sute de mii sau milioane de pb) şi existenţa unei largi game de mutaţii (heterogenitate alelică) pentru multe dintre ele fac ca această metodă să fie utilizată abia după ce existenţa unei mutaţii la nivelul unei anumite gene a fost demonstrată printr-o metodă indirectă, mai rapidă şi mai ieftină.

Tabelul 9.5 Metode indirecte de diagnostic molecular

Metoda	Avantaje	Dezavantaje
Mobilitatea electroforetică în gel a heteroduplexurilor	Metodă foarte simplă şi ieftină	Numai pentru secvenţe sub 200pb. Sensibilitate limitată. Nu relevă poziţia modificărilor.
Cromatografie de înaltă rezoluţie în soluţie denaturantă	Metodă rapidă, cantitativă	Echipament costisitor. Nu relevă poziţia modificărilor nucleotidice.
Polimorfismul conformaţiei ADN monocatenar (SSCP)	Metodă simplă, echipament ieftin.	Numai pentru secvenţe sub 200pb. Sensibilitate limitată. Nu relevă poziţia anomaliilor.
Electroforeză în gel cu gradient denaturant (DGGE)	Metodă sensibilă	Alegerea amorselor este critică. Amorsele sunt costisitoare. Nu relevă poziţia anomaliei.
Clivarea perechilor de baze anormale: (mismatch cleavage) Chimic, enzimatic	Metodă sensibilă. Identifică poziţia modificării nucleotidice.	Reactivi toxici. Metodă dificilă Rezultate de calitate slabă.
Testul proteinelor trunchiate (PTT)	Mare sensibilitate pentru mutaţiile cu terminare prematură a translaţiei. Identifică poziţia mutaţiei.	Numai pentru mutaţii cu încheiere prematură a lanţului. Metodă costisitoare, dificilă. Necesită ARN

Dideoxy fingerprinting	Mare sensibilitate.	Dificil de interpretat
"Cipuri" ADN de hibridizare de minisecvenţializare	Metode rapide, eficiente. Pot detecta şi defini toate modificările nucleotidice	Echipament costisitor. Gamă limitată de gene. Tehnologie nouă, încă în dezvoltare.
Analizele de înlănţuire	Metodă foarte simplă şi ieftină.	Necesită studii În cadrul familiilor

a. Metoda SSCP („single strand conformational polymorphism")

Analiza SSCP a fragmentelor de ADN genomic amplificate prin PCR se bazează pe tendinţa ADN-ului monocatenar de a forma structuri secundare prin legături de hidrogen, intramoleculare. Prezenţa unei mutaţii punctiforme determină modificarea legăturilor de hidrogen din interiorul moleculei şi deci şi a conformaţiei moleculei. Intrucât mobilitatea electroforetică în gel a moleculelor de ADN este dependentă nu numai de mărime, ci şi de conformaţia lor, două molecule de ADN monocatenar, care diferă numai printr-o singură bază, migrează electroforetic diferit (figura 9.11). Avantajul principal al SSCP constă în faptul că nu este necesară cunoaşterea precisă a mutaţiei sau a secvenţei complete a genei. Singura cerinţă este cunoaşterea parţială a secvenţei nucleotidice, pentru realizarea amorselor.

ADN-ul amplificat prin PCR este denaturat şi apoi aplicat imediat pe un gel nedenaturant, pentru a nu permite renaturarea în soluţie. In gel, catenele rămân separate, dar formează structuri secundare prin legături de hidrogen, deoarece ADN-ul bicatenar este mai stabil decât cel liniar, monocatenar. Catenele cu structuri diferite au mobilitate electroforetică diferită, SSCP putând detecta o diferenţă de o singură bază dintr-o catenă de 500 nucleotide. Izolarea din gel a fragmentului de ADN cu migrare anormală permite secvenţierea şi determinarea precisă a modificării nucleotidice. Modificarea secvenţei ADN poate sta sau nu la originea unei afecţiuni, prin urmare nu orice polimorfism reprezintă o mutaţie dezavantajoasă.

b. Metoda DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)

Metoda DGGE implică amestecarea fragmentelor de ADN genomic denaturat cu o probă ADN monocatenară, marcată (de obicei radioactiv) urmată de electroforeza acestui amestec într-un gel cu gradient denaturant. ADN-ul genomic identic ca secvenţă cu proba utilizată va forma cu aceasta un homoduplex care va rămâne stabil chiar şi în condiţiile denaturante din gel, în timp ce fragmentele de ADN care diferă de secvenţa probei formează iniţial heteroduplexuri cu aceasta, dar pe parcursul migrării sunt denaturate, rezultând o structură ramificată cu mobilitate redusă comparativ cu homoduplexul (vizualizarea se realizează prin autoradiografie) (figura 9.12).

c. Metoda clivării chimice a secvenţei anormale

Chemical cleavage mismatch (CCM) se bazează pe capacitatea unor substanţe chimice - hidroxilamină sau tetraoxid de osmiu – de a reacţiona cu nucleotide libere – citozina, respectiv timina. Prin denaturarea ADN-ului genomic dublu catenar şi hibridizarea sa cu o probă de ADN monocatenar marcată radioactiv, orice citozină, (respectiv timină) neîmperecheată va fi susceptibilă la reacţia cu hidroxilamina (respectiv tetraoxidul de osmiu). Adăugarea de piperidină duce la clivarea ADN-ului la nivelul acestor situsuri. Această tehnică localizează împerecherile greşite pentru ambele catene şi deci detectează indirect mutaţiile care implică substituţia cu adenină sau guanină prin identificarea timinelor sau citozinelor complementare din cealaltă catenă.

d. Testul proteinelor trunchiate (PTT)

Testul proteinelor trunchiate se bazează pe obţinerea de ADNc pornind de la ARN-ul mesager pe baza reacţiei de transcripţie inversă (RT-PCR). Transcripţia inversă presupune utilizarea unei amorse specifice care conţine un promotor şi o secvenţă de iniţiere a translaţiei. ADN-ul complementar rezultat este apoi supus transcripţiei şi translaţiei într-un sistem special. Produsul proteic este analizat prin electroforeză în gel, iar obţinerea unei proteine de dimensiuni mai mici (trunchiate) semnifică prezenţa unei mutaţii nonsens sau cu schimbarea cadrului de lectură în gena corespunzătoare (figura 9.13).

e. Analizele de înlănţuire

Analizele de înlănţuire se realizează în trei etape (vezi capitolul 3.D.1). În prima etapă se face diferenţierea celor doi cromosomi omologi la cuplul relevant (găsirea unui marker genetic – RFLPs, minisateliţi, microsateliţi – strâns înlănţuit cu alela mutantă pentru care părinţii sunt heterozigoţi). Apoi se determină "faza de înlănţuire" (identificarea cromosomului purtător al genei mutante). În final are loc identificarea setului de cromosomi primit de consultand de la părinţi.

C. SFATUL GENETIC.

1. DEFINIŢIE. OBIECTIVE. CIRCUMSTANŢE DE ACORDARE.

Sfatul genetic a fost definit ca un *proces de comunicare* care se ocupă cu problemele umane şi psihologice asociate cu prezenţa unei boli genetice sau cu riscul ei de apariţie într-o familie[8]. În esenţă, « pacienţii şi/sau rudele lor cu risc pentru o boală ce poate fi ereditară sunt sfătuiţi asupra consecinţelor bolii, probabilitatea apariţiei sau transmiterii ei în familie şi căile prin care aceasta poate fi prevenită sau ameliorată » (Harper, 1998).

Acest proces, efectuat de una sau mai multe persoane specializate (genetician, psiholog-consilier, asistent social), implică o încercare de a ajuta individul sau familia:

- să înţeleagă faptele medicale, inclusiv diagnosticul, evoluţia probabilă a bolii şi posibilităţile de îngrijire;
- să aprecieze modul în care factorii genetici contribuie la producerea bolii, modul ei de transmitere şi riscul de recurenţă la anumite rude;
- să înţeleagă opţiunile şi alternativele reproductive determinate de riscul de recurenţă ;
- să aleagă acţiunile care li se par corespunzătoare în raport cu riscul lor şi scopurile familiei lor şi să acţioneze în concordanţă cu această decizie informată;
- să facă cea mai bună corecţie posibilă a bolii la o persoană afectată din familie şi/sau a riscului de recurenţă a acelei boli.

Aceste obiective demonstrează evident că sfatul genetic este un *act medical, specializat şi complex*. El reprezintă de fapt *acţiunea finală a consultului genetic* (vezi figura 9.1) prin care medicul a stabilit diagnosticul şi prognosticul bolii probandului, posibilităţile de îngrijire şi recuperare, tipul de boală genetică şi riscul de recurenţă pentru consultand. Toate aceste date vor fi comunicate adecvat celor care le-au solicitat, pentru a lua decizii informate.

Sfatul genetic poate fi solicitat (vezi şi secţiunea A.3):

- *premarital* (mai rar) – atunci când unul dintre membrii cuplului este afectat de o boală genetică sau are o rudă apropiată afectată; o altă situaţie este posibilitatea unei uniuni consanguine;
- *preconcepţional* – pentru una din situaţiile menţionate mai sus la care se adaugă vârsta maternă peste 35 de ani sau existenţa unor tulburări de reproducere (de exemplu, avorturi spontane repetate);
- *prenatal* – în cazul unei expuneri accidentale la teratogeni sau a descoperirii unor semne ecografice de alarmă;
- *postnatal* – după naşterea unui copil afectat de o boală genetică sau anomalii congenitale

2. PRINCIPII ŞI METODOLOGIE.

Sfatul genetic necesită cunoştinţe, pricepere, abilitate de comunicare, umanism şi fineţe psihologică. Toate aceste calităţi se dobândesc şi se perfecţionează în timp cu condiţia înţelegerii importanţei şi particularităţilor acestei acţiuni. Unii geneticieni sau pediatri-geneticieni au remarcabile calităţi de diagnostic dar uneori minimalizează complexitatea sau

[8] După Comitetul de Sfat Genetic al Societăţii Americane de Genetică Umană (1975)

consecinţele sfatului genetic; exemplul clasic pentru această abordare simplistă este reprezentat de cazurile de sindrom Down, care sunt "rezolvate" uneori în câteva fraze. Vom încerca să prezentăm sintetic câteva principii şi modalităţi generale de acordare a sfatului genetic, care desigur nu pot fi decât un cadru general ce trebuie dezvoltat prin lectura unor lucrări dedicate acestui subiect şi mai ales prin exerciţii practice.

2.1 PRINCIPII GENERALE DE ACORDARE A SFATULUI GENETIC

(1) Medicul care acordă sfatul genetic (consilierul sau sfătuitorul genetic) trebuie să posede o pregătire adecvată în acest domeniu, permanent actualizată, care să-i permită să rezolve toate obiectivele sfatului genetic. Această parte tehnică trebuie dublată de umanism, capacitate de comunicare şi simţ psihologic.

(2) Acurateţea diagnosticului clinic şi etiologic este elementul esenţial al unui sfat genetic corect pentru că, la fel ca şi în alte specialităţi medicale, *"unde diagnostic nu e, nimic nu e..."*.

(3) Şedinţa de consiliere (ce se adresează cel mai frecvent unui cuplu) trebuie atent pregătită:

- Se va *planifica* atunci când diagnosticul a fost finalizat şi la un interval suficient de timp după un eveniment traumatizant pentru cuplu (naşterea unui copil malformat, decesul unui copil, pierderea unei sarcini dorite etc.);
  - Se vor identifica în prealabil (telefon, vizita asistentului social) necazurile şi preocupările consultandului/ părinţilor săi (dificultăţile de mobilitate, limbaj, înţelegere; statutul socio-economic) şi, eventual, dorinţa de a fi sau nu însoţit de cineva din familie, un prieten;
  - Se va insista asupra *prezenţei ambilor părinţi* sau membri ai cuplului deoarece nivelul de înţelegere al celor doi părinţi poate fi diferit iar transmiterea unor date de către părintele prezent spre celălalt părinte poate fi incompletă sau eronată, voit sau ne-voit.
- Se va analiza dosarul medical al consultandului/ probandului şi vor fi revăzute datele despre boală, pentru a stabili ce probleme vor fi discutate (vezi secţiunea 2.2).
- O atenţie specială se va acorda acţiunilor ce urmează după sfatul genetic: monitorizarea evoluţiei bolnavului, materiale documentare, legătura cu grupuri de sprijin sau asistenţi sociali, menţinerea legăturii cu medicul şi Centrul de genetică medicală (se va avea în vedere o nouă vizită, după o perioadă de timp)
- Se va aloca un timp adecvat, suficient pentru o primă discuţie, fără întreruperi, telefoane etc;
- Locul ales trebuie să nu fie stressant, să asigure intimitate şi confidenţialitate; prezenţa eventuală a altor persoane din echipă trebuie explicată şi aprobată de consultanţi.

(4) Explicaţiile oferite trebuie adaptate la *nivelul de înţelegere* al părinţilor iar limbajul adecvat nivelului lor de cunoştinţe. Pentru un sfat genetic eficient este indispensabil să se realizeze o comunicare reală cu aceştia, astfel ca părinţii să reţină toate elementele necesare unei percepţii exacte a situaţiei nou apărute în viaţa lor. Se vor evita formulări, expresii sau cuvinte greoaie, rare, necunoscute interlocutorilor. Este de preferat un limbaj simplu, exact, clar, fără prea multe noţiuni de specialitate.

(5) Se va acorda o atenţie deosebită problemelor psihologice ale sfatului genetic. Riscul genetic are o componentă afectivă atât pentru medic cât mai ales pentru cuplul care aşteaptă cu nerăbdare şi teamă verdictul medicului. De aceea se poate spune că "*riscul se calculează la rece şi se transmite cu căldură*". Pacienţii şi familiile cu probleme genetice sunt aproape întotdeauna supuşi unui stress emoţional şi social care poate merge până la detrese grave. Unii pacienţi au tăria să se confrunte personal cu asemenea probleme; ei preferă să primească orice veste proastă decât să rămână neinformaţi şi ei iau singuri decizii pe baza informaţiilor ce le obţin. Alţii, reclamă mult mai mult suport şi chiar au nevoie de psihoterapie.

(6) Un aspect deosebit al sfatului genetic este *caracterul non-direcţional*: medicul

sfătuieşte cuplul consultant, dar nu ia decizii în locul acestuia. Important este ca membrii cuplului consultant să conştientizeze toate implicaţiile bolii şi să ia deciziile cunoscând toate informaţiile referitoare la aceasta.

(7) Sfatul genetic *nu se termină* odată cu transmiterea datelor şi riscului ci include o serie de acţiuni ulterioare.

- Trebuie stabilit cât mai clar posibil dacă pacienţii au înţeles într-adevăr ceea ce li s-a spus despre boală, despre măsurile posibile, despre risc. Este surprinzător că multe informaţii sunt uitate sau greşit interpretate. Un sistem de urmărire periodică (implicând medicul sau/şi o asistentă socială) este util.
- Totdeauna se va da consultanţilor şi medicului de familie o scrisoare ce sintetizează punctele esenţiale ale consultaţiei, inclusiv riscul, pentru ca pacienţii să poată avea un document de referinţă, clar, asupra căruia să revină atunci când cred că este nevoie să-şi precizeze, explice, unele date şi concluzii.
- Sprijinul realizării optiunilor reproductive decise de către consultanţi.
- Sprijin activ pentru rezolvarea oricărei probleme ulterioare privind îngrijirea bolnavului, planificarea familială, suportul socio-economic

2.2. PROBLEME CE VOR FI PUSE ÎN DISCUŢIE

Problemele ce vor fi puse în dicuţie derivă din obiectivele sfatului genetic. Dar, înainte de orice, consultanţii trebuie să înţeleagă clar scopul şi conţinutul sfatului genetic, la ce se pot aştepta din această acţiune şi ce sprijin vor primi; ei vor fi asiguraţi de confidenţialitatea datelor şi caracterul non-directiv al informaţiilor: deciziile le aparţin şi trebuie luate pe baza unor elemente clare, bine fundamentate.

- Se va începe prezentând afecţiunea probandului sau „problema” cu care se confruntă cuplul, manifestările şi consecinţele ei, evoluţia probabilă (istoricul natural) şi prognosticul bolii, posibilităţile de îngrijire şi de prevenire a unor complicaţii. În faţa unui bolnav sau a unor părinţi cu un copil bolnav este bine să folosim un ton optimist, încurajator.
- Apoi se va explica natura genetică a bolii, mecanismul de producere şi modul de transmitere ereditară. În această explicaţie ne putem confrunta cu o serie de concepţii greşite despre ereditate, izvorâte fie din tradiţie, fie din ignoranţă, fie din lipsă de cultură medicală (tabelul 9.6); vom încerca să le limpezim cu tact şi răbdare, pentru a reuşi să convingem şi să lămurim lucrurile (vezi şi capitolul 8.C.2).

Tabelul 9.6. Concepţii greşite despre afecţiunile ereditare

Absenţa altor cazuri de boală în familie înseamnă că boala nu este genetică, ereditară şi invers, orice boală familială este genetică.
Orice afecţiune congenitală este şi genetică.
Toate bolile genetice sunt ereditare, în sensul de transmitere.
Traumele mentale sau psihice în cursul sarcinii produc malformaţii.
Toate bolile genetice sunt netratabile
Un risc de 1:2 ar însemna că tot al doilea copil va fi afectat sau un risc de 1:4 ar însemna că după un copil bolnav următorii 3 copii nu vor fi afectaţi;
Un risc de 1 din 20 (de ex., pentru spina bifida) înseamnă o şansă din 20 de a avea un copil normal.
Dacă în familie există doar femei sau bărbaţi afectaţi boala are transmitere legată de un cromosom sexual
Toate bolile genetice pot fi detectate prin analiză cromosomică

- Prezentarea riscului se va face în toate formele posibile (de exemplu : 25%, ¼, 1 din 4), subliniind concomitent gravitatea afecţiunii, posibilităţile terapeutice, şansele unei vieţi independente, inserţia socială etc. În funcţie de aceşti factori şi fără a influenţa decizia consultanţilor, prezentarea riscului se poate face în mai multe variante – după exemplul « paharul este pe jumătate gol sau pe jumătate plin » - mai ales în funcţie de gradul de handicap. Se va preciza că riscurile se referă la viitor, se aplică la fiecare sarcină indiferent de ce s-a întâmplat la celelalte sarcini (« şansa/riscul nu are memorie »). Multe persoane nu au o idee clară despre ceea ce înseamnă un risc « mare » sau « mic ». De aceea este utilă

compararea riscului calculat cu riscurile din populaţia generală (tabelul 9.7); în felul acesta riscul va fi mai bine înţeles şi impactul mai uşor de suportat.

Tabelul 9.7. Riscuri în populaţia generală

Afecţiune	Risc general
Avort spontan	1/5-1/6
Deces perinatal	1/30 – 1/100
Deces neonatal*	1/150
Deces în primul an de viaţă*	1/500
Malformaţii congenitale majore	1/33 sau 2-3%
Handicap mental sau fizic major	1/50 sau 1-2%
Cancer în perioada adultă	1/4 sau 25%

* Datele sunt valabile pentru ţările dezvoltate

- Se vor discuta (în aceeaşi şedinţă sau ulterior) alternativele şi opţiunile reproductive determinate de riscul de recurenţă sau posibilităţile şi opţiunile de testare genetică, avantajele şi dezavantajele lor, implicaţiile psihologice şi sociale, modul de realizare/obţinere :
  - alternativele reproductive sunt : contracepţia (reversibilă sau definitivă), reproducere asistată (prin donare de gameţi), diagnosticul pre-implantator sau adopţia ;
  - opţiunile reproductive includ : diagnosticul prenatal, terminarea sau continuarea unei sarcini cu un făt afectat ;
  - opţiunile de testare şi acţiunile preventive sunt valabile pentru persoanele cu risc pentru boli cu debut tardiv ; o situaţie specială este testarea stării de purtător sănătos.
  - Consultanţii vor fi încurajaţi să aleagă acţiunile care li se par corespunzătoare în raport cu riscul lor şi scopurile familei.
- O problemă importantă ce trebuie obligatoriu abordată este existenţa altor persoane, rude, cu risc genetic crescut în familie – care rezultă din caracterul genetic al bolii şi datele arborelui genealogic. Consultanţii vor fi încurajaţi să informeze aceste persoane asupra riscului şi utlităţii prezentării la medicul genetician sau dacă nu vor/nu pot să o facă ei însăşi li se va cere acordul scris pentru ca medicul să-i contacteze şi informeze.

3. RISCUL GENETIC ÎN BOLILE CROMOSOMICE

Sfatul genetic în bolile cromosomice prezintă dificultăţi legate de tipul anomaliei cromosomice, sexul pacientului la care este prezentă anomalia, gradul de afectare a reproducerii, modalitatea de segregare a cromosomilor în cursul meiozei şi viabilitatea produşilor de concepţie. Fără a intra în detalii, vom prezenta succint câteva repere practice.

3.1 SFATUL GENETIC ÎN ANOMALIILE CROMOSOMICE NUMERICE.

În **sindromul Down**, riscul de recurenţă depinde, în primul rând, de tipul anomaliei.

- În cazul *trisomiei 21 libere omogene* riscul de recurenţă variază cu vârsta maternă în momentul concepţiei, fiind de 0,1% la 30 de ani, de 0,3% la 35 de ani, de 1% la 40 de ani şi de 4,4% la 45 de ani (tabelul 9.8). Practic, se poate considera că la femeile sub 30 de ani riscul de recurenţă al sindromului Down este nesemnificativ. Totuşi se recomandă efectuarea analizei cromosomice prenatale la toate gravidele care au avut deja un copil cu sindrom Down prin trisomie 21 liberă omogenă (posibilitatea unui mozaic germinal) şi mai ales la gravidele peste 35 de ani.
- În cazurile de sindrom Down prin *trisomie 21 în mozaic*, riscul de recurenţă a afecţiunii este nesemnificativ, deoarece anomalia este determinată de un accident mitotic în primele etape ale dezvoltării embrionare.
- În *trisomia 21 prin translocaţie Robertsoniană neechilibrată* se impune obligatoriu efectuarea analizei cromosomice la ambii părinţi. În cazul în care translocaţia este *de novo,* ambii părinţi având cariotip normal, riscul de recurenţă a bolii este mai mic de 1%. În cazul

în care translocaţia este prezentă la tată, riscul de recurenţă este mai mic de 1%, deoarece prezenţa anomaliei cromosomice induce o blocare a meiozei **în spermatocitele cu dezechilibru cromosomic**. În cazul în care translocaţia este prezentă la mamă, riscul de recurenţă depinde de tipul anomaliei. În translocaţiile Robertsoniene între cromosomi acrocentrici neomologi, riscul de naştere al unui nou copil cu sindrom Down este de 10%. În schimb, în cazul prezenţei unei translocaţii Robertsoniene t(21;21) riscul de recurenţă este total de 100%.

Tabelul 9.8. Corelaţia între vârsta maternă în momentul concepţiei şi riscul de sindrom Down la descendenţi (după Hecht şi Hook, 1994)

Vârsta maternă (ani)	Prevalenţa sindromului Down la naştere	
	‰	1/ nn
20	0,65	1560
30	1,12	890
35	2,81	355
36	3,57	280
37	4,59	220
38	5,98	170
39	7,84	130
40	10,4	97
41	13,8	73
42	18,3	55
43	24,5	41
44	32,8	30
45	44,1	23

În cazul **altor aneuploidii viabile** (trisomiile 13, 18, 45,X, 47,XXY, 47,XYY şi trisomia XXX) riscul de recurenţă este mai mic de 1%. În aceste cazuri, este indicată efectuarea analizei cromosomice prenatale mai mult din motive psihologice.

3.2. SFATUL GENETIC ÎN ANOMALIILE CROMOSOMICE STRUCTURALE ECHILIBRATE

În anomaliile cromosomice echilibrate riscul purtătorului de a avea un descendent cu o monosomie şi/sau trisomie parţială depinde de sexul purtătorului, cromosomii implicaţi şi de tipul anomaliei. Deseori în cazul bărbaţilor purtători de anomalii echilibrate între autosomi, se poate observa afectarea gametogenezei, ce poate merge până la blocarea ei. În schimb, meioza feminină este rareori afectată de existenţa lor.

a. Translocaţiile reciproce echilibrate

În translocaţiile reciproce echilibrate riscul purtătorului de a avea un descendent cu o anomalie cromosomică structurală neechilibrată este de circa **5-10%,** în funcţie de sexul purtătorului, cromosomii implicaţi şi de tipul anomaliei.

Majoritatea aneuploidiilor parţiale viabile (96%) conţin monosomii parţiale mai mici de 2% sau trisomii parţiale mai mici de 4% din materialul genetic al unui set haploid de cromosomi. Produşii de concepţie cu anomalii cromosomice parţiale mai severe sunt avortaţi. De aceea riscul unui purtător de translocaţii ca sarcina să se încheie prin avort spontan este de aproximativ **20-30%.** O situaţie particulară apare în cazul existenţei unor translocaţii X-autosom. Jumătate dintre femeile purtătoare şi toţi bărbaţii purtători ai unei astfel de translocaţii sunt sterili. Femeile care sunt fertile prezintă un risc de **20-40%** de a avea descendenţi anormali, cu formulă cromosomică neechilibrată.

b. Translocaţiile Robertsoniene

În cazul translocaţiilor Robertsoniene între cromosomul 21 şi un alt cromosom prezente la unul dintre părinţi, riscul de recurenţă este: <1% dacă anomalia este la tată şi 10-12% dacă este prezentă la mamă; în translocaţiile Robertsoniene între cromosomi 21 riscul de recurenţă este de 100%;

c. Inversiile pericentrice

Riscul general al unui pacient cu o inversie pericentrică de a avea un descendent cu anomalie cromosomică neechilibrată datorită recombinării intracromosomice este de circa 5-10%. Riscul de apariţie al unui descendent anormal este direct proporţional cu lungimea fragmentului inversat şi invers proporţional cu lungimea fragmentelor neinversate. Unele inversii, precum cele ale regiunii heterocromatiniene ale cromosomilor 1, 9, 16 sau Y sau inversiile inv(3)(p11-13;q11-12) inv(5)(p13;q13) şi inv(10)(p11.2;q21.2) nu prezintă nici un risc pentru descendenţi.

d. Inversiile paracentrice

Riscul este nul deoarece prin crossing-over la nivelul buclei de inversie rezultă gameţi cu cromosomi acentrici sau dicentrici, neviabili.

e. Inserţiile

Inserţiile reprezintă rearanjamentele cromosomice cu cel mai mare risc de copii anormali. Riscul global în inserţiile intracromosomice este de **15%,** dar este posibil ca această cifră să reprezinte o subestimare. În situaţiile în care fragmentul inserat este mare, există un risc crescut de recombinare la nivelul segmentului inserat, produşii de concepţie cu anomalii cromosomice neechilibrate sunt, de regulă, neviabili (avorturi spontane), iar riscul pentru descendenţi anormali va fi de **0-5%.** În cazul în care inserţia este de dimensiuni mici, produşii de concepţie cu trisomie parţială sunt viabili, iar cei cu monosomie parţială sunt neviabili, fiind avortaţi. Într-o astfel de situaţie riscul teoretic al unui purtător de inserţie de a avea un copil afectat este de aproximativ 33%, în timp ce riscul practic este de **10-20%.**

4. RISCUL GENETIC ÎN BOLILE MONOGENICE

Calcularea riscului de recurenţă în bolile monogenice este, în principiu, o problemă simplă, în condiţiile în care se cunosc principiile de transmitere mendeliene (vezi capitolul 5.D) şi genotipurile persoanelor consultate. Totuşi dacă nu se cunosc genotipurile lucrurile se complică fiind necesară aplicarea legilor probabilităţilor şi teoremei Bayes.

Calcularea riscului genetic presupune cunoaşterea unor elemente de calcul al probabilităţilor.

Un eveniment se poate realiza cu mai multe probabilităţi. De exemplu, un părinte heterozigot (AB) poate transmite la un copil fie gena „**A”** fie gena „**B”**; există deci două posibilităţi, dar numai una din ele se va realiza. Probabilitatea („**p**”) a evenimentului „**A**” este identică cu probabilitatea evenimentului ”**B**” şi egală cu ½ sau, mai general, probabilitatea de a se produce un eveniment este egală cu:

$$\mathbf{p} = \frac{\text{numărul cazurilor favorabile}}{\text{numărul cazurilor posibile}} = \frac{n}{N}$$

Probabilitatea producerii unui eveniment este cuprinsă între 0 (imposibilitate) şi 1 (certitudine).

Dacă un eveniment (transmiterea genei „**A”**, în exemplul de mai sus) nu se produce înseamnă că se realizează fenomenul contrar (transmiterea genei „**B”**), a cărui probabilitate „**q**” este:

$$\mathbf{q} = \frac{\text{numărul cazurilor favorabile}}{\text{numărul cazurilor posibile}} = \frac{N-n}{N} = 1 - \frac{n}{N} \text{ sau } 1 - p$$

deci $\mathbf{q = 1 - p}$ sau altfel scris: $\mathbf{p + q = 1}$; aceasta înseamnă că *probabilitatea tuturor evenimentelor este egală cu 1*.

Calculul probabilităţilor se bazează pe câteva teoreme şi legea Hardy-Weinberg.

- **Teorema probabilităţilor compuse** (legea multiplicării): dacă pentru realizarea unui eveniment sunt *necesare* două sau mai multe evenimente independente, atunci probabilitatea acestui eveniment este egală cu *produsul* probabilităţilor individuale de producere ale fiecărui eveniment: $p=p_1 \times p_2$

  De exemplu, într-o boală recesiv autosomală, probabilitatea unui cuplu sănătos, neînrudit, care provine din familii în care nu există cazuri de boală, de a avea un copil bolnav este egală cu produsul a trei probabilităţi:
  - probabilitatea mamei de a fi heterozigotă, Na;
  - probabilitatea tatălui de a fi heterozigot, Na;
  - probabilitatea unui cuplu heterozigot de a avea un copil bolnav (relaţia 12.3.).

$$P_B = P_M \times P_T \times P_C = 2pq \times 2pq \times \frac{1}{4}^2$$

unde: P_B - probabilitatea copilului de a fi bolnav, P_M - probabilitatea mamei de a fi heterozigotă, P_T - probabilitatea tatălui de a fi heterozigot, P_C - probabilitatea unui cuplu heterozigot de a avea un copil afectat. P_T şi P_M de a fi heterozigoţi este 2pq = frecvenţa heterozigoţilor în populaţie (conform legii Hardy-Weinberg) iar P_C = ¼ .

- **Teorema probabilităţilor totale** (legea adunării) : dacă un eveniment poate fi realizat prin două sau mai multe evenimente independente, atunci probabilitatea acestui eveniment este egală cu *suma* probabilităţilor de realizare a fiecăruia din evenimente ce-l pot realiza, produse independent unul de altul.

De exemplu, probabilitatea unui cuplu heterozigot (Na) pentru o boală recesiv autosomală de a avea un copil sănătos (P_{CS}) este egală cu suma probabilităţii de a avea un copil sănătos homozigot (P_{NN}=1/4) şi a probabilităţii de a avea un copil sănătos heterozigot (P_{Na}=1/2).

	N	a
N	NN	Na
a	Na	aa

$P_{CS} = P_{NN} + P_{Na} = 1/4 + 2/4 = ¾$

- **Teorema probabilităţilor cauzei sau Teorema Bayes** ia în considerare toate posibilităţile sau evenimentele (*probabilitate condiţională*) care modifică probabilitatea iniţială (*probabilitate anterioară*) şi permite calcularea unei probabilităţi corijate (*probabilitate posterioară*) pe baza acestor date. În felul acesta, în calcularea riscului actual se va ţine cont de o serie de evenimente (condiţii) ce pot interveni : penetranţă incompletă, expresivitate variabilă (mai ales privind vârsta de debut), mutaţii *de novo* (în multe boli autosomal dominante sau legate de X), rezultatele unor teste orientative de laborator (de exemplu, dozarea CPK în bolile musculare), număr de copii neafectaţi / afectaţi în familie, ş.a.

În cadrul teoremei Bayes sunt luate în calcul patru categorii de probabilităţi:

- **probabilitatea anterioară (P_A)** reprezintă probabilitatea iniţială a unui eveniment şi se calculează pe baza informaţiilor "anterioare", cum ar fi anamneza familială;
- **probabilitatea condiţională** (**P_C**) reprezintă probabilitatea evenimentului în funcţie de anumite condiţii;
- **probabilitatea combinată sau unită** este produsul (P_A x P_C) dintre probabilitatea anterioară (P_A) şi probabilitatea condiţională (P_C) când cele două situaţii pot apărea împreună (sau suma lor, când cele două situaţii se exclud reciproc).
- **probabilitatea posterioară sau relativă (P_R)** reprezintă raportul dintre probabilitatea combinată a unui eveniment (de ex., de a fi bolnav) şi suma tuturor probabilităţilor combinate ale tuturor posibilităţilor (de ex., de a fi bolnav şi de a nu fi bolnav)

De exemplu, dacă notăm cu **$P_{(A)}$** probabilitatea anterioară de apariţie a unui eveniment (de ex., de a fi bolnav), cu **$P_{(NA)}$** probabilitatea anterioară ca acel eveniment să nu apară (de ex., de a nu fi bolnav), cu **$P_{(C)}$** probabilitatea condiţională ca un al doilea eveniment (de ex, prezenţa altor copii sau vârsta de manifestare) să fie asociat cu evenimentul luat în discuţie (**A)** şi cu **$P_{(NC)}$** probabilitatea condiţională ca cel de al doilea eveniment să nu fie asociat cu evenimentul luat în discuţie, atunci probabilitatea posterioară (**P_R)** sau relativă de apariţie a evenimentului luat în discuţie (**a**), asociat cu cel de-al doilea eveniment este dată de relaţia:

$$P_P = \frac{P_A \times P_C}{\left[P_A \times P_C\right] + \left[P_{NA} \times P_{NC}\right]}$$

În ultimă instanţă această formulă reprezintă raportul dintre numărul cazurilor „favorabile" – la numărător – şi numărul total al cazurilor posibile, la numitor.

Aplicarea acestei formule (exemplificată în secţiunile următoare) devine puţin mai clară dacă se construieşte un tabel Bayesian:

	Evenimentul A se produce	Evenimentul A nu se produce (NA)
Probabilitate Anterioară	P_A	P_{NA}
Condiţională	P_C	P_{NC}
Combinată	P_A x P_C	P_{NA} x P_{NC}

Probabilitatea Posterioară	$P_P = \frac{P_A \times P_C}{[P_A \times P_C] + [P_{NA} \times P_{NC}]}$

4.1 SFATUL GENETIC ÎN BOLILE AUTOSOMAL DOMINANTE

Calcularea riscului de recurenţă a afecţiunii în bolile autosomal dominante este uşor de calculat în condiţiile în care boala are *penetranţă completă* şi este lipsită de expresivitate variabilă. În aceste condiţii riscul este următorul:

- un cuplu în care un părinte este bolnav heterozigot (An) iar celălalt sănătos (nn) are un risc de 1/2 de a avea un descendent afectat
- doi părinţi bolnavi heterozigoţi (An) au un risc de 3/4 de a avea un descendent afectat
- doi părinţi sănătoşi (nn) au un risc 0 de a avea un descendent afectat[9]

a). Boli dominante cu penentranţă incompletă

În numeroase boli dominante a fost observat fenomenul de penetranţă incompletă, caracterizat prin absenţa manifestărilor clinice la o parte dintre heterozigoţi. Penetranţa, notată P, reprezintă raportul dintre indivizii afectaţi de o boală dominantă şi indivizii purtători ai genei anormale (AA + An), înmulţit cu 100 .

$$\mathbf{P} = \frac{B}{AA + An} \times 100$$

Pentru bolile cu penetranţă incompletă, la calcularea riscului de recurenţă a afecţiunii trebuie să se ţină cont şi de valoarea **P**. De exemplu, în cazul unui bolnav heterozigot (I1) cu o boală AD cu penetranţă de 80% sau 0,8, căsătorit cu o femeie sănătoasă (I2), riscul de a avea un copil afectat (II1) va fi dat de produsul 1/2 x P = ½ x 0.8= 0,4 (figura 9.14).

În condiţiile în care un individ sănătos are un părinte afectat de o boală autosomală dominantă cu penetranţă incompletă şi doreşte să afle riscul copiilor săi de a fi afectaţi, trebuie aplicată teorema Bayes (figura 9.15.).

Probabilitate	**II.1. heterozigot**	**II.1. neheterozigot**
Anterioară	1/2	1/2
Condiţională - clinic normal	1-**P**	1
Unită/combinată	½ x (1-**P**)	½ x 1 = ½
Posterioară		

- Rezultă că probabilitatea individului II.1 de a fi heterozigot este (1-P)/(2-P)
- probabilitatea individului III.1. de a fi afectat poate fi determinată calculând produsul următoarelor probabilităţi: *probabilitatea relativă a individului II.1 de a fi heterozigot (An)* ori *probabilitatea individului III.1 de a moşteni gena A* ori *penetranţa.*

Folosind formula de mai sus şi diferite grade de penetranţă s-a calculat că riscul maxim al unui individ care are un bunic afectat de o boală AD cu penetranţă redusă în condiţiile în care tatăl (mama) este clinic sănătos, nu depăşeşte valoarea de 0,086 ≈ 1/12.

b). Expresivitatea variabilă

[9] riscul real este egal cu rata mutaţiei genei respective în populaţia generală, dar de obicei acest risc este nesemnificativ

O mare parte dintre maladiile dominant autosomale se caracterizează prin expresivitate variabilă, persoanele bolnave din familii diferite sau chiar din aceeaşi familie având un grad diferit de afectare. În aceste condiţii, persoanele mediu afectate îşi pun problema care este riscul descendenţilor lor de a avea o formă gravă de afectare. Acest risc poate fi uşor de calculat în condiţiile în care incidenţa în populaţie a formei severe de afectare este cunoscută. În această situaţie, se aplică următoarea formulă:

c). Boli autosomal dominante cu debut tardiv.

Mai multe boli AD se caracterizează prin debut la vârste variabile în viaţa adultă (boala Huntington, ADPKD, hipercolesterolemia familială etc). Pentru boala Huntington au fost calculate probabilitatea manifestării bolii la diferite vârste şi probabilitatea unui individ de a fi purtător de genă mutantă (heterozigot) dacă este clinic neafectat (tabelul 9.9).

Tabelul 9.9 Riscuri aproximative la diferite vârste pentru persoane clinic neafectate de a fi heterozigoţi pentru boala Huntington

Vârsta (ani)	Probabilitatea detectării expresiei genice	Probabilitatea de a fi heterozigot dacă este clinic sănătos
20	0,02	0,49
25	0,05	0,48
30	0,1	0,47
35	0,2	0,44
40	0,3	0,41
45	0,35	0,39
50	0,5	0,33
55	0,65	0,26
60	0,75	0,20
65	0,85	0,13
70	0,95	0,05

De exemplu, un bărbat în vârstă de 60 de ani (II-1) are mama (I-1) decedată de boală Huntington. Probabilitatea sa iniţială de a fi heterozigot este 50% sau 0,5; ea se modifică, conform teoremei Bayes, ţinând cont de faptul că la 60 de ani este neafectat, astfel că probabilitatea posterioară de a fi heterozigot, în aceste condiţii, este de 0,02.

	Pacientul este heterozigot normal	Pacientul este homozigot normal
Probabilitatea Anterioară	0,5	0,5
Condiţională (sănătos la 60 ani)	0,25	1
Combinată	0,5 x 0,25 = 0,125	0,5 x 1 = 0,5
Probabilitatea posterioară	0,125/ (0,125+0,5) = 0,2	

d. Boli autosomal dominante cu anticipaţie

Într-o serie de afecţiuni dominant autosomale a fost evidenţiat fenomenul de anticipaţie, caracterizat prin debutul mai precoce şi existenţa unei forme de boală mai grave la descendenţii unei persoane afectate. Majoritatea acestor afecţiuni sunt determinate de mutaţii dinamice, caracterizate prin amplificarea unor repetiţii trinucleotidice în cursul meiozei indivizilor afectaţi, astfel încât descendenţii lor moştenesc un număr sporit de repetiţii.

Calcularea riscului în astfel de afecţiuni se poate realiza doar în mod empiric, deoarece la momentul actual nu există nici o metodă concretă de apreciere a riscului. De exemplu, în boala Huntington,

determinată de amplificarea unei secvenţe CAG, au fost stabilite, pe baza datelor epidemiologice, următoarele corelaţii: 40 trinucleotide - vârstă de debut 56 ani; 45 trinucleotide - vârstă de debut 37 de ani; 50 trinucleotide - vârstă de debut 26 ani, dar totuşi nu se pot face estimări exacte.

4.2 SFATUL GENETIC ÎN BOLILE AUTOSOMAL RECESIVE

În general, calcularea riscului de recurenţă şi acordarea sfatului genetic într-o afecţiune cu transmitere autosomal recesivă este relativ uşor de realizat, pe baza datelor din arborele genealogic şi Legea Hardy-Weinberg, care permite calcularea frecvenţei heterozigoţilor (2pq) (vezi capitolul 7.A.2). Dacă, de exemplu, o boală are o frecvenţă populaţională de 1 la 10.000, atunci q^2 = 1/10.000, q = 1/100 iar 2pq = 2 x 99/100 x 1/100 ≈1/50

În condiţiile în care copilul afectat al unui cuplu sănătos (figura 9.16) este homozigot **aa**, cei doi părinţi sunt obligatoriu heterozigoţi **Na**. Riscul lor de a avea un alt copil afectat este de **1/4** iar probabilitatea fiecărui descendent sănătos al cuplului de a fi heterozigot **Na** este de **2/3**.

O situaţie frecvent întâlnită în cazul acordării sfatului genetic este aceea în care medicul trebuie să calculeze riscul unui descendent cu o boală autosomal recesivă în cazul căsătoriei între un individ care provine dintr-o familie afectată şi o persoană provenind din populaţia generală. Condiţia obligatorie ca doi indivizi sănătoşi să aibă un copil afectat de o boală autosomal recesivă este ca ambii membri ai cuplului să fie heterozigoţi. Pentru individul care provine din populaţia generală, probabilitatea acestuia de a fi heterozigot este de **2pq** sau 2 x radical din frecvenţa bolii. În cazul persoanei care provine din familia în care există cazuri de boală, calcularea probabilităţii de a fi heterozigot depinde de gradul de înrudire cu individul afectat (figura 9.17., tabelul 9.10). În aceste condiţii calcularea riscului de recurenţă al bolii se poate face simplu folosind produsul probabilităţilor. De exemplu, dacă luăm în considerare un cuplu (figura 9.18) în care fratele soţului (II.1) este afectat de fenilcetonurie, iar soţia (II.3) provine din populaţia generală – în care frecvenţa bolii este de 1/10.000, iar frecvenţa heterozigoţilor este 1/50 – riscul acestui cuplu de a avea un copil (III.1) afectat este: $P_{III-1} = P_{M(Na)} \times P_{T(Na)} \times 1/4 = 1/50 \times 2/3 \times 1/4 = 1/300$

Tabelul 9.10. Probabilitatea de a fi heterozigot Na a rudelor unui individ bolnav aa

Relaţie	Na
Părinţi, copii	1
Frate - soră	2/3
Bunici, unchi, mătuşi, nepoţi de la copii	1/2
Nepoţi de la frate sau soră	1/3
Verişori primari	1/4
Copiii verişorilor primari	1/8

O altă situaţie particulară apare atunci când un individ afectat de o boală recesivă autosomală doreşte să afle riscul de a avea descendenţi afectaţi (aa). În acest caz, riscul se calculează în felul următor: $P_{C(aa)} = P_{T(a)} \times P_{M(a)} = 1 \times 1/2\ P_{M(Na)}$.

În cazul bolilor cu transmitere autosomal recesivă riscul de recurenţă a bolii creşte la cuplurile consanguine, deoarece cei doi membri ai cuplului posedă o serie de alele identice (inclusiv gene mutante), moştenite de la un strămoş comun. De aceea ei au o probabilitate crescută de a transmite gena mutantă la descendenţi, care vor fi homozigoţi **aa** afectaţi. De

exemplu, în cazul căsătoriei între doi veri primari, care au avut un bunic afectat de o boală autosomală recesivă, riscul de recurenţă al bolii la descendenţi este de 1/16 (figura 9.19.).

4.3 SFATUL GENETIC ÎN BOLILE RECESIVE LEGATE DE X

În bolile recesive cu transmitere legată de cromosomul X se pun mai multe probleme, funcţie de rata mutaţiilor, de numărul bolnavilor, al copiilor sănătoşi şi, eventual, a unor teste disponibile pentru a stabili (cu un anumit grad de relativitate) starea de purtător. Ele pot fi rezolvate adecvat recurgând la teorema Bayes.

a. Probabilitatea ca orice femeie să fie purtătoare a unei gene mutante legate de X.

Orice femeie are o *probabilitate iniţială (anterioară)* egală cu 4 μ de a fi purtătoarea unei boli recesive legate de X (cu *fitness* zero la bărbaţi) (unde μ este frecvenţa mutaţiilor noi pe cromosomul X patern). Valoarea 4 μ a fost calculată astfel:
femeia ar fi purtătoare dacă moşteneşte o mutaţie nouă pe cromozomul X patern (ν) sau dacă moşteneşte o mutaţie o mutaţie nouă pe cromozomul X matern (μ). Dacă acceptăm o rată egală a mutaţiilor la bărbaţi şi la femei (ambele reprezentate prin μ), fiecare femeie are un risc de 1/2 din riscul mamei, plus suma ratei mutaţiei la bărbaţi (μ) şi femei (ν) sau 2 μ (deoarece μ = ν). Aceasta conduce la formularea unei serii infinite în care riscul va deveni 4 μ:

Risc = 2 μ+ 1/2 (2 μ) + 1/4 (2 μ) + 1/8 (2 μ), etc.

mutaţie nouă la stră-bunica
mutaţie nouă la bunica
mutaţie nouă la mamă
mutaţie nouă la consultand

Această serie poate fi re-aranjată plasând 2 μ înafara parantezelor: 2μ (1+1/2+1/4+1/8+...), relaţie care, după un număr infinit de generaţii, devine 2 μ (2), adică 4 μ .

b) Probabilitatea ca mama unui caz izolat să fie purtătoare

Se poate calcula aplicând teorema Bayes

	Ipoteza I Mama purtătoare	Ipoteza II Mama nepurtătoare
Probabilitate anterioară (iniţială)	4 μ	1 - 4μ ≈ 1
condiţională combinată (unită)	½ 4μ x ½ = 2μ	μ 1 x μ = μ
Probabilitate posterioară (relativă)	$\frac{2\mu}{2\mu+\mu}=\frac{2}{3}$	$\frac{\mu}{2\mu+\mu}=\frac{1}{3}$

In funcţie de probabilitatea 2/3 a mamei de a fi purtătoare se poate calcula probabilitatea altor femei din familie (figura 9.20) de a fi heterozigote.

c. Probabilitatea unei femei de a fi heterozigotă dacă are mai mulţi copii neafectaţi

O femeie (III2) a cărui frate (III3) şi unchi matern (II3) sunt afectaţi de distrofie musculară Duchenne, doreşte să afle riscul de a avea un băiat bolnav (IV4) în condiţiile în care are deja trei băieţi sănătoşi (IV1, 2, 3) (figura 9.21)

În această situaţie, dacă facem abstracţie de cei trei băieţi sănătoşi ai consultantei, riscul ei de a avea un băiat bolnav ar fi de 1/4, deoarece probabilitatea iniţială (anterioară) a femeii de a fi heterozigotă este de 1/2, iar probabilitatea ei de a transmite gena anormală la

băieţi este de asemenea 1/2 (relaţia 12.5.). Pentru a afla care este probabilitatea reală (posterioară) a femeii de a fi heterozigotă, având deja trei copii sănătoşi (probabilitate condiţională), aplicăm teorema Bayes:

	III-3 este heterozigotă	III-3 nu este heterozigotă
probabilitatea anterioară	1/2	1/2
condiţională (3 copii sănătoşi)	1/2x1/2x1/2=1/8	1 x 1 x 1 = 1
combinată	1/2 x 1/8 = 1/16	1/2 x 1= 1/2
Probabilitate Posterioară	1/2 x 1/8 / (1/2 x1/8)+(1/2 x 1) = 1/9	

Ţinând cont de această probabilitate posterioară (relativă), rezultă că riscul copilului de IV4 de a fi afectat este 1/2 x 1/9 = 1/18, mult mai mic decât cel de 1/4 obţinut fără a ţine cont de datele suplimentare furnizate de analiza arborelui genealogic.

d. Probabilitatea unei femei de a fi heterozigotă pentru o boală recesivă legată de X în familiile în care există mai mulţi bolnavi

În familiile în care există mai multe cazuri de boală recesivă legată de X riscul unei femei de a fi heterozigotă se poate calcula de asemenea cu ajutorul teormei Bayes, funcţie de probabilitatea mamei sale de a fi purtătoare. Examinând figura 9.22 (a), se observă că probabilitatea femeii III.4. de a fi heterozigotă, ştiind că mama ei este cert heterozigotă, este de ½. Pentru arborele genealogic din figura 9.24 (b), fără a aplica teorema Bayes, se observă că persoana III.4. are o probabilitate de ¼ de a fi heterozigotă, ştiind că bunica sa maternă este cert heterozigotă iar mama ei (II-4) are o probabilitate de ½ de a fi heterozigotă. Trebuie însă să luăm în considerare faptul că femeia II.2. are trei băieţi sănătoşi şi să aplicăm teorema Bayes

	Ipoteza I Femeia II.2. purtătoare	Ipoteza II Femeia II.2. nepurtătoare
Probabilitate anterioară	1/2	1/2
condiţională	$(1/2)^3=1/8$	1
combinată	1/2 x 1/8 = 1/16	1/2 x 1 = 1/2
Probabilitate posterioară	$\frac{1/16}{1/16+1/2}=\frac{1/16}{9/16}=\frac{1}{9}$	

Se poate observa că în aceste condiţii probabilitatea femeii II.2. de a fi purtătoare este de 1/9 (≈11%), iar cea a fiicei sale de 1/9 x 1/2 = 1/18 (≈5,5%), mult mai mică decât cea de ¼ (25%) obţinută făcând abstracţie de faptul că mama sa a născut 3 băieţi sănătoşi.

5. RISCUL GENETIC ÎN BOLILE MULTIFACTORIALE

Bolile multifactoriale au un determinism mixt, genetic şi ecologic, dar mecanismul patogenic nu este încă descifrat. Participarea unor factori genetici (vezi capitolul 5.E.2.) implică un risc de recurenţă care însă nu poate fi calculat. De aceea evaluarea riscului se bazează pe *date empirice*, rezultate din studii populaţionale, pe un număr mare de familii în care există unul sau mai mulţi bolnavi. În aceste condiţii, pentru acordarea sfatului genetic în bolile multifactoriale (anomalii congenitale, unele boli comune ale adultului) trebuie respectate o serie de principii generale.

- Riscul empiric reprezintă *un risc mediu* pentru boala respectivă în populaţia din care face parte probandul şi astfel acest risc este posibil ca în familia studiată riscul mediu să nu fie identic cu cel real;

- În general, riscul empiric de recurenţă în fratrie sau descendenţă pentru malformaţiile congenitale izolte, cu o frecvenţă ≥ de 1 la 1000 nou-născuţi, este de circa 2-5%; pentru bolile comune, cu o frecvenţă ≥ de 1 la 100, riscul este de circa 10%.
- Riscul de recurenţă al afecţiunii este influenţat de o serie de factori:
  - *Gradul de rudenie cu probandul*. Riscul de recurenţă la rudele de gradul I este mult mai mare decât la alte persoane din familie; de exemplu, descendenţii şi fraţii unui proband cu despicătură labială[10] au un risc de 3,15 şi respectiv 2,79; rudele de gradul doi şi trei au riscuri mult mai mici, de 0,47 % şi respectiv 0,27%.
  - *Prezenţa unei forme mai severe de boală la proband*. Dacă probandul are o despicătură labială unilaterală riscul la fraţi este 1,9%; el creşte la 6,6% dacă dacă probandul are o despicătură labială şi palatină bilaterală.
  - *Prezenţa în familie a mai multor indivizi afectaţi*. În cazul despicăturilor labiale dacă sunt afectaţi doi fraţi riscul la următoarea naştere este de 10%; dacă sunt afectaţi un părinte şi un copil atunci riscul pentru un alt copil afectat este circa 14%.
  - *Sexul probandului*. Riscul creşte dacă în familie există bolnavi de un anumit sex la care boala respectivă este, în mod normal, mai puţin frecventă (de exemplu, luxaţia congenitală de şold la băieţi su stenoza pilorică la fete);
  - *Există căsătorii consanguine*.
- În cazul în care pentru anumite boli multifactoriale nu există informaţii privind riscul empiric pentru o populaţie dată[11] se poate recurge la riscurile calculate în tabelul 9. 11 pe baza frecvenţei în populaţie şi a *heritabilităţii* afecţiunii respective, precum şi a numărului de persoane afectate (aceste date şu multe altele se găsesc în programul computerizat RISKMF, elaborat de Charles Smith, 1972). De exemplu dacă din anamneza familială a unui consultand rezultă că unul din părinţi şi un frate au schizofrenie (frecvenţa în populaţie 1%, heritabilitate 80%) atunci riscul său este 18,7%.

Tabelul 9.11 Riscuri de recurenţă în boli multifactoriale (după Smith, 1972)

Frecvenţa în populaţie (%)	**Heritabilitate (%)**	**Părinţi afectaţi**								
		0			**1**			**2**		
		Fraţi afectaţi								
		0	**1**	**2**	**0**	**1**	**2**	**0**	**1**	**2**
1,0	80	0,9	6,7	14,6	8,5	18,7	27,9	40,3	45,9	50,6
	60	1,0	4,9	10,6	5,7	12,3	19,2	21,7	28,3	34,1
	40	1,0	3,3	6,5	3,5	7,0	1,2	9,7	14,1	18,7
0,5	80	0,5	5,1	12,3	6,2	15,5	24,3	37,6	43,2	47,9
	60	0,5	3,4	8,4	3,8	9,5	15,8	18,1	24,4	30,0
	40	0,5	2,1	4,7	2,2	4,9	8,3	7,0	10,8	14,9
0,1	80	0,1	2,6	8,4	2,9	9,8	17,6	30,4	36,7	41,2
	60	0,1	1,5	4,6	1,5	5,0	9,6	11,5	17,1	22,2
	40	0,1	0,7	0,7	0,7	2,2	4,2	3,6	6,0	8,7

Tabelul este util mai ales atunci când în familie sunt prezente mai multe persoane afectate. De remarcat însă faptul că în tabel nu se iau în calcul rudele afecate de gradul doi sau trei; se admite că două rude afectate de gradul doi sau mai multe rude afectate de gradul trei vor fi echivalente cu o rudă afectată de gradul unu. Dacă in familie este prezentă o singură persoană afectată, de gradul unu (I_1), doi (I_2) sau trei (I_3) riscul poate fi estimat folosind formulele elaborate de Edwars (1976): $I_1 = P^{½}$, $I_2 = P^{¾}$, $I_3 = P^{7/8}$

D. SERVICIILE DE GENETICĂ CLINICĂ

1. DEFINIŢIE

[10] Datele folosite ca exemplificare provin din studiul familial al despicăturii labiale±palatine efectuate de Carter et al, 1982.

[11] Pentru unele afecţiuni, ca de exemplu defectele de tub neural, există variaţii goegrafice şi temporale importante ale riscului empiric

Serviciile de genetică sunt servicii medicale *specializate* pentru a ajuta (medical şi psihologic) *pacienţii* cu boli genetice sau anomalii congenitale (indiferent de cauză) precum şi *familiile* lor „...să trăiască şi să se reproducă cât mai normal posibil" (OMS,1985,1996).

- Patologia genetică şi malformativă poate afecta *orice sistem de organe,* se manifestă la *orice vârstă* şi necesită *teste speciale* de diagnostic, complet diferite de alte analize de laborator clinic. Aceste trei caracteristici determină complexitatea serviciilor de genetică medicală şi necesitatea unei *echipe multidisciplinare* de profesionişti, cadre medicale sau non-medicale, care să acţioneze *coordonat* pentru îngrijirea şi prevenţia lor.
- Implicarea *familiei* este generată de natura ereditară a factorilor de boală, care trebuie evaluaţi la rudele bolnavului, eventual în mai multe generaţii. Deoarece patologia genetică poate avea consecinţe asupra întregiii familii, în cadrul serviciilor de genetică *unitatea de studiu este familia.*

În funcţie de natura şi obiectivele lor, serviciile de genetică pot fi axate pe bolnavi şi familiile lor (servicii de genetică clinică) sau pe întreaga populaţie (servicii de genetică comunitară sau de sănătate publică).

2. OBIECTIVE

Serviciile de genetică clinică, bazate pe indivizi/familie, au următoarele obiective:

- rezolvarea problemelor medicale (diagnostic, îngrijire, sfat genetic) şi psihologice ale bolnavilor şi familiilor lor;
- Identificarea şi supravegherea indivizilor şi/sau familiilor cu risc genetic crescut cu scopul de a creşte şansele unor descendenţi sănătoşi;
- Evaluarea riscului ca unele persoane sănătoase să dezvolte o boală monogenică cu debut tardiv sau o afecţiune multifactorială cu predispoziţie genetică.

Serviciile de genetică comunitară, axate pe întreaga populaţie şi/sau subgrupe de risc (de exemplu, grupe etnice), urmăresc *profilaxia primară* (evitarea cauzelor)*, secundară* (depistarea precoce) *şi terţiară* (reducerea consecinţelor, prevenirea complicaţiilor) a bolilor genetice şi anomaliilor congenitale la nivel populaţional (vezi capitolul 18). În acest scop se folosesc **programe** de sănătate publică axate pe: screeningul şi urmărirea prenatală şi neonatală, identificarea precoce, monitorizarea şi urmărirea defectelor congenitale, serviciile de informare (educaţie) şi evaluare a teratogenilor, screening-ul populaţiilor selecţionate.

3. ORGANIZARE[12]

Organizarea eficientă a serviciilor de genetică medicală trebuie să se bazeze pe trei principii: *prioritate, regionalizare şi integrare*. Înfiinţarea şi dezvoltarea unor servicii de genetică medicală în România este o *prioritate* absolută, ținând cont de ponderea şi consecinţele patologiei genetice (vezi capitolul 8.C.3) precum şi de situaţia actuală.

Soluţia optimă – recomandată de OMS şi Societatea Europeană de Genetică umană – este o *reţea naţională* de Centre regionale de genetică medicală – unităţi terţiare – şi Cabinete de genetică medicală satelite (în spitalele judeţene) – unităţi secundare – conectate cu unităţile de asistenţă primară, medicii de familie, baza reţelei. Cu alte cuvinte, activităţile de genetică medicală vor fi organizate, într-*o manieră ierarhizată şi coordonată*, la toate cele trei niveluri de asistenţă medicală, pentru a profita la maximum de resursele existente. Realizarea unor legături bidirecţionale, în trepte, între cele trei niveluri de asistenţă genetică este decisivă pentru eficienţa lor.

Această schemă de organizare a serviciilor de genetică medicală – rezultată prin analizele efectuate de către experţi, la nivel European – mai prevede două elemete: *integrarea* serviciilor de genetică cu alte servicii înrudite (asistenţă preconcepţională, prenatală, neonatală, servicii speciale dedicate anumitor

[12] Datele sintetice prezentate în această secţiune se bazează pe Recomandările Societăţii Europene de Genetică Umană *„Provision of genetic services in Europe – current practices and issues"* (2001)

boli) şi înfiinţarea unor unităţi naţionale speciale de diagnostic sau îngrijire a unor anumite categorii de bolnavi. ; acreditarea CGM şi coordonarea lor va fi asigurată de un Consiliu Naţional.

Centrele de genetică medicală (CGM) trebuie să fie unităţi *integrate* într-un mare spital (centru terţiar), care să permită colaborări interclinice de mare calitate, explorări clinice şi paraclinice complete; ele trebuie să fie dotate cu *capacităţi proprii* de explorare la nivel cromosomic, biochimic, molecular.

Fiecare Centru va acoperi o regiune definită, de 1,5–3 milioane de locuitori. Numărul de medici geneticieni va fi de 2-3 la 1 milion de locuitori, iar staff-ul de laborator (deobicei ne-medical) de 4 la 1 milion. La această echipă se vor adăuga alte cadre superioare şi medii, *medicale* şi *nonmedicale* (psihologi, asistenţi de genetică, asistenţi sociali, informaticieni, etc). Nu în ultimul rând, CGM trebuie să aibă o logistică solidă, resurse bioinformatice şi comunicaţii, o bibliotecă cuprinzătoare.

Furnizarea de servicii medicale genetice de calitate (consult, explorare, sfat genetic) se va face de către cadre specializate, pe baza unor *ghiduri clinice sau protocoale de laborator standard* pentru cea mai bună practică, disponibile pe web-site-uri. Va funcţiona un *control de calitate*, intern şi extern, pentru clinică şi laboratoare, precum şi un sistem eficient de *educaţie medicală continuă*.

Aceste reguli profesionale vor fi obligatoriu dublate de o *acoperire financiară* adecvată, de către MSF şi Casele de asigurări de sănătate. CGM trebuie să posede toate resursele necesare unui diagnostic de calitate, decisiv pentru îngrijirea bolnavului şi familiei. Consultul şi sfatul genetic pare scump, consumator de timp iar testele genetice sunt foarte scumpe. Totusi, deoarece un individ sau familie nu au prea des nevoie de servicii genetice (testele genetice se fac *« o dată în viaţă »*) iar beneficiile pe termen lung sub aspectul diagnosticului corect (care elimină alte explorări), prevenţiei şi tratamentului adecvat sunt importante, sfatul genetic este în ansamblu economic si eficace.

3. FUNCŢII

a) Consultaţii genetice.

Serviciile de genetică clinică se ocupă deobicei cu diagnosticul clinic, paraclinic şi genetic în bolile monogenice, anomaliile cromosomice, sindroamele plurimalformative cu sau fără retard mintal, tulburările de reproducere; mai recent, graţie tehnicilor noi de genetică moleculară, au apărut noi preocupări : testele predictive pentru *bolile neurogenetice şi* cancerele ereditare/familiale ; deşi aceste cancere reprezintă o mică parte din toate cancerele ele reprezintă un număr considerabil de cazuri în comparaţie cu bolile rare văzute de obicei de medicii geneticieni.

Deoarece bolile genetice sunt foarte numeroase iar diagnosticul lor este deseori dificil, singura cale de a acorda servicii corecte este de a perfecţiona experienţa specialiştilor de genetică clinică şi sindromologie, de a cunoaşte utilizarea perfectă a bazelor de date specializate accesibile pe Internet sau CD-ROM şi de a consulta alţi specialişti, folosind poşta elctronică sau, în viitor, teleconsultaţiile.

b) Informare şi sfat genetic

Acordarea sfatului genetic este o caracteristică definitorie a serviciilor de genetică clinică şi o componentă obligatorie a evaluării genetice.

Acest proces, implică o încercare de a ajuta individul sau familia de:

- a înţelege faptele medicale, inclusiv diagnosticul, evoluţia probabilă a bolii şi posibilităţile de îngrijire;
- a aprecia cum contribuie factorii genetici la producerea bolii şi care este riscul de recurenţă la rudele bolnavului;
- a înţelege opţiunile reproductive corelate cu acest risc de recurenţă ;
- a alege acţiunile care sunt corespunzătoare pentru ei în raport cu mărimea riscului, scopurile familei şi a acţiona în concordanţă cu această decizie informată;
- a face tot ce este posibil pentru corectarea afecţiunii şi/sau reducerea riscului ei (Evers-Kebooms, 2000)

Problemele tehnice şi etice ale sfatului genetic au fost discutate în secţiunea precedentă ; vom sublinia doar necesitatea unui limbaj adecvat, discuţii repetate şi, în final, *o informare scrisă*.

Pacienţilor li se va facilita *accesul la alte materiale informative* despre boală, precum şi la *grupurile de sprijin.*

c). Diagnostic prenatal (DPN)

DPN a devenit o activitate constantă a serviciilor de genetică din următoarele raţiuni :

- în condiţiile extensiei evaluării ultrasonografice a fătului în practica medicală este necesară *interpretarea datelor prenatale* (« semne de alarmă ») care pot reflecta o boală genetică sau un defect sever de altă natură;
- DPN este recomandat familiilor cu risc genetic crescut de boli genetice care pot fi detectate antenatal; testele de DPN trebuie însă precedate de un sfat genetic adecvat, preferabil înaintea unei noi sarcini, ocazie cu care se vor discuta toate opţiunile reproductive, riscurile şi incertitudinile DPN.
- Dacă este diagnosticată prenatal o boală genetică, familia are opţiunea de a continua sau nu sarcina ; în prima situaţie se vor lua măsuri adecvate de urmărire a sarcinii şi asistenţă specială a nou născutului; în a doua situaţie, după întreruperea sarcinii şi analiza fătului se vor discuta cu familia riscurile de recurenţă şi opţiunile posibile.

d).Testare genetică

Fără a intra acum în detalii (vezi capitolul 18) vom preciza că dezvoltarea metodelor de diagnostic molecular a permis introducerea în practica medicală a *testării presimptomatice* – pentru boli ce se debutează mai târziu în cursul vieţii (un test anormal indică dezvoltarea aproape invariabilă a bolii, la o anumită vârstă), precum şi a *testării predictive* - termen ce are un sens mai larg, referindu-se la situaţii în care riscul de boală este crescut, fără a implica un grad de certitudine. Ambele testări dau informaţii asupra *statusului viitor de sănătate al unei persoane sănătoase.*

e). Alte activităţi

- Asigurarea unei *asistenţe efective, continue şi anticipative* a bolnavilor şi a persoanelor sănătoase cu risc;
- *Păstrarea* corectă şi confidenţială a datelor genetice ale pacienţilor (fişe de consult genetic, buletine de analize, protocoale de îngrijire, buletine de sfat genetic);
- Realizarea de *Registre genetice* pentru anomalii congenitale sau pentru anumite boli ereditare frecvente (vezi capitolul 18);
- *Formarea de* specialişti în genetică medicală şi educaţia medicală continuă;
- *Educarea genetică* a studenţilor, medicilor de familie, altor specialişti, asistentelor medicale sau personalului non-medical;
- Unele programe de genetică comunitară;
- Cercetare;
- Monitorizarea continuă a eficienţei şi calităţii serviciilor clinice şi de laborator.

4. PRINCIPII ETICE

Din punct de vedere etic, activităţile serviciilor de genetică vor fi bazate pe principiul *autodeterminării persoanei interesate* ; orice test genetic, inclusiv testele genetice sistematice, nu se vor face fără un *consimţământ liber şi informat ;* nu se va pune nici-o condiţie pentru acceptarea sau efectuarea testelor genetice. O atenţie specială se va acorda testării minorilor şi persoanelor cu retard mintal, la care investigaţia va fi permisă numai atunci când este necesară pentru sănătatea lor sau dacă informaţiile sunt absolut necesare pentru diagnosticul unei boli genetice la membrii familiei lor.

Familiile vor decide singure dacă doresc sau nu sfat genetic si vor alege liber unde să meargă pentru sfat. *Caracterul non-direcţional* al sfatului genetic va fi o regulă generală.

Confidenţialitatea are o importanţă decisivă şi pacienţii vor trebui să fie întrebaţi dacă sunt de acord ca rezultatele testelor lor să fie făcute cunoscute şi de alţi membri ai familiei, explicându-le că transmiterea acestor informaţii este spre binele tuturor. Oricum se va garanta *confidenţialitatea pentru familie mai curând decât pentru individ* (ţinând cont de caracterul familial al bolilor genetice).

INTERNET

1. Alliance of Genetic Support Groups: http://www.geneticalliance.org
2. HELIX.University of Washington, Children's Hospital and Medical Care - sfat şi teste genetice: http://www.healthlinks.washington.edu/helix/

3. Genealogie *online*: http://www.genealogy.org
4. Geneclinics (http://geneclinics.org)
5. Genetic Interest Group (GIG) – alianţă naţională (UK) a peste 120 de organizaţii de sprijin a persoanelor cu diferite boli genetice: http://www.gig.org.uk
6. LDDB (http://www.hgmp.mrc.ac.uk/DHMHD/lddb.html)
7. MEDLINE/PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
8. National Organization for Rare Disorders (NORD): http://www.pcnet.com/~orphan/
9. OMIM: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omin/
10. Orphanet (http://orphanet.infobiogen.fr)
11. POSSUM (http://possum.net.au/)
12. Program Australian ce prezintă informaţii privind construcţia unui arbore genealogic: http://www.genetics.com.au/fhtg.htm

Bibliografie specifică selectivă

1. Bates B. – *A guide to physical examination* – 3rd ed. Lippincott, Philadelphia, 1983
2. Bennett RL, Steinhaus KA, Uhrich SR et al. – *Recommandations for standardized human pedigree nomenclature* – Am.J.HumGenet. 1995;56:745-752
3. Bennett RL – *The practical guide to the genetic family history* – Wiley-Liss, New York, 1999
4. Baker DL, Schuette JL, Uhlmann WR. – *A guide to genetic counseling* - Wiley-Liss, 1998, New York
5. Burke W. (2002) – *Genetic testing* – N. Engl. J. Med., 347: 1867-1875.
6. Evans CD. – *Computers system in dysmorphology* – Clin. Dysmorphol 1995; 4: 185-201
7. Genetic Interest Group – *Guidelines for genetic services* – London, 1998
8. Hall BD. – *State of the art of dysmorphology* – Am.J.Dis.Child 1993; 147:1184-1189
9. Harris R., Reid M. - *Medical Genetic Services in 31 countries: on owerview* + Europ.J.Hum.Genet. 1997; 5 (suppl.2) 3-21.
10. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J. – *Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis* – N. Engl. J. Med., 1993; 329:1982-1987;
11. Pyeritz RE. – *Family history and genetic risk factors. Forward to the future* . JAMA, 1997;278:1284-1285
12. Royal College of Physicians – *Clinical genetics services into 21st century* – London, 1996.
13. Royal College of Physicians – *Clinical genetics services :activity, outcome, effectiveness and quality* – London, 1998.
14. Slaney, S. F. Wilkie, A. O. M.. Hirst, M. C. Charlton, R. McKinley, M. Pointon, J. Christodoulou, Z. Huson, S. M. Davies, K. E. – *DNA testing for fragile X syndrome in schools for learning difficulties* – Arch.Dis.Child. 1995; 72: 33-37.
15. Stromme / *The diagnostic of syndromes by use of a dysmorphology databas* – Acta Paediatr Scand 1991; 80: 106-109
16. WHO/WAOPAD – *Services for the Prevention and Management of Genetic Disorders and Birth Defects in Developing Countries* - Report of a joint WHO/WAOPBD meeting The Hague, 5-7 January 1999.
17. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN – *An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms* – Nucleic Acids Res.,2001;29:E88-89.

CAPITOLUL 10

BOLILE CROMOSOMICE

Anomaliile cromosomice constituţionale pot sau nu să producă un dezechilibru genetic şi în funcţie de acest efect consecinţele lor fenotipice sunt diferite (vezi capitolul 6.C).

- Anomaliile de număr sau structură *neechilibrate* determină un fenotip anormal al embrionului, care cel mai frecvent este letal, produsul de concepţie eliminându-se ca avort spontan sau nou născut mort. Numai 1 la 250 de nou născuţi vii au trisomii sau monosomii, complete sau parţiale, care produc anomalii fenotipice caracteristice unor sindroame cromosomice specifice; anomaliile autosomale sunt mai grave decât cele gonosomale, manifestându-se prin tulburări de creştere, retard mintal, anomalii somatice (majore şi/sau minore); anomaliile cromosomilor sexuali produc în special disgenezii gonadice.
- Anomaliile de structură *echilibrate* deşi în marea lor majoritate nu modifică fenotipul purtătorului pot produce tulburări de reproducere, fie prin blocarea gametogenezei fie prin producerea unor gameţi anormali.

Numeroase studii epidemiologice au demonstrat că anomaliile cromosomice reprezintă o cauză majoră de morbiditate şi mortalitate şi de tulburări de reproducere (vezi tabelul 6.6 capitolul 6.C.3). Medicii din numeroase specialităţi vor fi confruntaţi cu patologia cromosomică şi de aceea ei trebuie să cunoască reperele fenotipice majore care „pot semnaliza" acest tip de patologie, precum şi situaţiile concrete în care ar trebui să recomande o analiză cromosomică, prenatală sau postanatală (vezi capitolul 9.B.1).

A. BOLI CROMOSOMICE AUTOSOMALE.

Bolile cromosomice produse prin anomalii neechilibrate ale autosomilor sunt numeroase (peste 100 de entităţi). Există numai trei anomalii *complete şi omogene* compatibile cu supravieţuirea: trisomia 21 (sindromul Down), trisomia 18 (sindromul Edwards) şi trisomia 13 (sindromul Patau); alte trisomii autosomale sunt rare şi se găsesc în mozaic. Anomaliile de structură neechilibrate produc trisomii şi monosomii *parţiale* dintre care vom semnala în special sindromul velo-cardio-facial (del 22q11) considerat al doilea ca frecvenţă după sindromul Down.

Înainte de a descrie succint principalele entităţi clinice (detalii puteti gasi pe internet) vom preciza câteva idei:

- anomaliile fenotipice caracteristice fiecărei afecţiuni sunt determinate de *anomalii de dozaj ale unor gene specifice* situate pe cromosomii/segmentele cromosomice implicate; pentru moment se cunosc puţine date despre aceste gene dar cu siguranţă ele vor apărea în viitorul apropiat schimbând probabil substanţial modul de abordare a acestor afecţiuni;
- dezechilibrul genetic, indiferent de tip, determină o serie de *„semne comune"* (Opitz, 1981): tulburări de creştere prenatală şi postnatală, dismorfie facială şi, frecvent, anomalii congenitale majore multiple, displazii, dermatoglife anormale, alterări ale structurii şi funcţiei SNC (retard mintal), tulburări ale funcţiei gonadale; cunoaşterea lor poate orienta un diagnostic spre categoria „boli cromosomice".
- gravitatea afectării fenotipice depinde de mai mulţi factori: mărimea dezechilibrului genetic; tipul de anomalie cromosomică; conţinutul genic şi cantitatea de eucromatină / heterocromatină a cromosomului implica; numărul celulelor afectate (aneuploidii omogene sau în mozaic)(vezi capitolul 6.C.2).

- deşi bolile cromosomice sunt incurabile iar posibilităţile de profilaxie limitate, există totuşi multiple acţiuni care pot ameliora îngrijirea bolnavilor precum şi depistarea prenatală precoce.

1. TRISOMIILE AUTOSOMALE

1.1. SINDROMUL DOWN SAU TRISOMIA 21

Sindromul Down sau trisomia 21 este cea mai frecventă şi cea mai bine cunoscută boală cromosomică. A fost descrisă clinic de John Langdon Down în 1866 dar, abia în 1959, Jerome Lejeune şi colaboratorii au stabilit că afecţiunea este produsă de trisomia 21.

Incidenţa trisomiei 21 a fost estimată la 1:650 – 1:800 nou-născuţi vii (prevalenţa globală este – după Bray et al, 1998 – de 1,42 la 1000 (1/704); frecvenţa produşilor de concepţie cu trisomie 21 este însă mult mai mare (1 la 200) dar circa ¾ sunt eliminaţi ca avorturi spontane. Boala este mai frecventă la copiii de sex masculin, raportul sexelor fiind de 3 băieţi la 2 fete.

Simptomatologia clinică diferă în funcţie de vârsta la care este examinat pacientul. De obicei sindromul Down este diagnosticat clinic („*gestalat*") în perioada neonatală sau la sugar datorită dismorfiilor evocatoare, care, deşi variază la diferiţi pacienţi, realizează un aspect fenotipic caracteristic[1] (*„...dacă ai văzut un copil cu sindromul Down i-ai văzut pe toţi"*).

Nou-născutul cu trisomie 21 are lungime şi greutate mai mică decât parametrii vârstei gestaţionale, prezintă hipotonie musculară, hiperextensibilitate şi reflexe comportamentale (de exemplu, reflexul Moro) reduse. Capul este brahicefalic, cu occiput turtit şi fontanele largi. Faţa este rotundă, plată şi prezintă o dismorfie sugestivă: epicantus (un repliu în unghiul intern al ochiului), fantele palpebrale oblice în sus şi în afară[2]; nasul mic cu rădăcina turtită şi narine mici şi anteversate; gura deschisă şi protruzie linguală (datorită cavităţii orale mici); urechile mai jos situate, mici şi displazice. Gâtul este scurt, cu exces de piele pe ceafă; mâinile sunt scurte şi late, cu brahidactilie, clinodactilie (încurbarea) a degetului V şi, frecvent, un singur pliu de flexie palmară (pliu simian); inconstant sunt prezente unele malformaţii viscerale (defecte cardiace, atrezie duodenală, imperforaţie anală)

La *sugar şi copil* fenotipul sindromului Down prezintă elementele descrise mai sus. Talia şi greutatea se află sub media vârstei, hipotonia musculară persistă şi se asociază cu hiperlaxitate articulară şi hiporeflexie nervoasă. Devin mai evidente câteva dismorfii cranio-faciale: microcefalia cu occiput turtit, fantele palpebrale oblice în sus şi în afară (mai ales când sugarul plânge), irisul pestriţ (cu pete Brushfield, de culoare maronie), hipoplazia etajului mijlociu al feţei (faţă plată), limbă protruzionată (şi mai târziu plicaturată) (figura 10.1). La nivelul membrelor brahidactilia şi clinodactilia auricularului sunt mai pronunţate, se pot observa (cu o lupă sau prin amprentare) dermatoglifele anormale (pliu palmar transvers unic, exces de bucle cubitale, triradius axial situat distal, ş.a.) iar spaţiul interdigital I la picior este mult mai larg. Vom preciza că nici unul din aceste semne, luate separat, nu este relevant; numai în asociere cu celelalte semne permite evocarea diagnosticului de sindromul Down (tabelul 10.1). Confirmarea citogenetică este obligatorie, mai ales pentru realizarea unui sfat genetic corect.

Tabelul 10.1. Semnele cardinale pentru diagnosticul de sindrom Down în perioada neonatală şi de sugar
(adaptat după Hall, 1966)

Semne	**Frecvenţă (%)**

[1] Diagnosticul este mai dificl la prematuri
[2] Aceste caracteristici au dus la denumirea improprie şi prohibită de *mongolism*.

Hipotonie musculară	100
Reflex Moro redus	85
Profil facial plat	90
Fante palpebrale oblice în sus şi în afară	80
Urechi mici, rotunde, jos situate	60
Exces de piele pe ceafă	80
Pliu simian	45
Hiperlaxitate articulară	80
Pelvis displazic	70
Clinodactilie	60
Prezenţa a 6 din cele 10 semne pledează pentru diagnosticul de sindrom Down	

Aşa cum am precizat, unii copii cu sindrom Down pot prezenta *diferite malformaţii viscerale:* cardio-vasculare, digestive şi renale. Malformaţiile cardiace afectează aproximativ 40% din nou-născuţii cu sindrom Down, majoritatea fiind defecte septale (atrio-ventriculare, ventriculare sau atriale). Malformaţiile digestive (3-5%) mai frecvente sunt atreziile sau stenozele duodenale şi megacolonul.

În al doilea an de viaţă devine evidentă întârzierea de dezvoltare psiho-motorie: toate achiziţiile copilăriei se fac cu 2-3 ani mai târziu decât normal; mersul este mult timp nesigur iar vorbirea relativ simplă. Copiii sunt însă liniştiţi, ascultători, au o personalitate atrăgătoare, iubesc anturajul, muzica, veselia. Dar, din păcate, sindromul Down se asociază *întotdeauna cu un retard mental* care variază de la sever la moderat (coeficientul de inteligenţă – QI – al persoanelor afectate variază între 20 şi 85) şi este asociat cu tulburări de limbaj. Un bolnav cu sindrom Down poate acumula un nivel maxim de cunoştinţe comparabil cu cel al unui copil normal cu vârsta între 6 şi 8 ani şi *nu este capabil de o viaţă independentă*.

În sindromul Down ritmul de creştere este redus şi talia va fi cu ≥2 DS sub media normală a vârstei (talia maximă la adult va fi de 140 – 160 cm). Frecvent se asociază obezitatea iar dezvoltarea pubertară este mult întârziată şi incompletă. Bărbaţii sunt sterili iar femeile au o fertilitate redusă; reproducerea este însă numai accidentală, tinând cont de handicapul intelectual.

Diagnosticul clinic diferenţial al sindromului Down se impune în puţine situaţii. Macroglosia şi microstomia din sindromul Down trebuie diferenţiate de cele din hipotiroidia congenitală sau din sindromul Beckwith-Wiedemann; unele elemente ale dismorfiei cranio-faciale se întâlnesc şi în sindroamele Smith-Magenis, Zellweger sau triplo-X (pentru detalii vezi OMIM sau ORPHANET). Prin efectuarea cariotipului se realizează certificarea diagnosticului de sindrom Down.

Analiza citogenetică este esenţială pentru diagnostic şi obligatorie în fiecare caz, chiar dacă examenul clinic este relevant, deoarece în funcţie de rezultatul analizei cromosomice se calculează riscul de recurenţă şi se acordă sfatul genetic. Analiza cromosomică poate evidenţia:

- *trisomie 21 liberă şi omogenă*, în circa 92-95% din cazurile de sindrom Down; ele se produc prin nedisjuncţie meiotică, cel mai frecvent (85-90%) maternă şi în special în meioza I (75%)[3];
- *trisomie 21 liberă şi în mozaic cromosomic* (de tip 47/46), în circa 2-3% din cazuri; rezultă prin nedisjuncţie mitotică postzigotică sau, foarte rar, prin pierderea unui cromosom 21 în celule ce derivă dintr-un zigot trisomic („salvarea" unei trisomii omogene);
- *trisomie 21 prin translocaţie Robertsoniană neechilibrată* – între cromosomul 21 şi un alt cromosom acrocentric – poate fi observată în 4-5% din cazuri; cel mai frecvent se întâlneşte

[3] Originea maternă sau paternă a nedisjuncţiei meiotice şi tipul ei – nedisjuncţie în meioza I sau meioza II – au fost stabilite prin tehnici moleculare.

translocaţia 14q;21q care în jumătate din cazuri este moştenită de la unul dintre părinţi (cel mai adesea de la mamă, dar fără nici o legătură cu vârsta maternă); translocaţiile 21q;22q sau 21q;21q sunt mult mai rare şi majoritatea sunt *de novo*;

- *trisomie 21 parţială*, în mai puţin de 1% din cazuri; rezultă prin segregarea meiotică a cromosomilor derivativi, formaţi în urma unor translocaţii echilibrate (ce implică un segment din cromosomul 21), prezente la unul dintre părinţi.

Evoluţie şi prognostic. În primii ani de viaţă mulţi dintre copiii cu sindrom Down sunt confruntaţi cu diferite probleme medicale. Cele mai importante sunt determinate de malformaţiile viscerale, în special cardiace şi digestive. Infecţiile respiratorii sunt frecvente (printr-o imunodeficienţă nespecifică) iar riscul de a dezvolta leucemie este de 15-20 ori mai mare decât în populaţia generală. Din aceste motive, mortalitatea în primii 5 ani de viaţă este (era !) mare şi în 1960 numai jumătate dintre copii cu sindrom Down supravieţuiau până la această vârstă. În ultimii 30 de ani, în ţările dezvoltate, rata de supravieţuire s-a îmbunătăţit semnificativ (prin tratamentul chirurgical al cardiopatiilor congenitale, antibioterapie, reducerea instituţionalizării şi integrare socială) iar speranţa de viaţă este acum de circa 60 de ani. Între 5 şi 39 de ani mortalitatea în sindromul Down este aproximativ asemănătoare cu cea din populaţia generală; totuşi morbiditatea este mai crescută : un procent de circa 10-15% din pacienţii cu sindrom Down pot prezenta una din următoarele probleme medicale: epilepsie, tulburări vizuale (cataractă, glaucom, strabism), surditate, hipotiroidie, instabilitate atlanto-axială. După 40 de ani se instalează frecvent o demenţă senilă precoce şi mortalitatea creşte semnificativ prin accidente vasculare. În ţările dezvoltate, rata de supravieţuire la 50 de ani este de 85% iar la 60 de ani este de numai 44%, adică jumătate din aceea a populaţiei generale.

Etiologie şi patogenie

Sindromul Down este produs de trisomia cromosomului 21 şi mai exact de trisomia regiunii 21q22 (numită şi DSCR – *Down Syndrome Crtitical Region*). Prin analiza moleculară a rarelor cazuri de trisomii 21 parţiale s-a stabilit că în regiunea 21q22.1-22.3 se găsesc genele care, prin efect de dozaj, produc majoritatea semnelor clinice caracteristice sindromului Down.

Secvenţierea recentă a cromosomului 21 permite în principiu identificarea oricărei gene de pe cromosom. În prezent conţinutul genic al cromosomului 21 este estimat a fi de 329, cu 165 de gene confirmate experimental, 150 de gene prezise pe baza analizei secvenţeleor exprimate (tag) şi 14 predicţii computerizate. O caracteristică oarecum neaşteptată este faptul că fracţia cromosomului 21 care este transcrisă în ARN este de fapt mai mare decât cea care este ocupată de secvenţele codante ale genelor.

Un mijloc utilizat pentru studiul genelor implicate în producerea manifestărilor clinice din sindromul Down este acela al modelelor animale. La şoareci, genele corespunzatoare cromosomului uman 21 se afla localizate pe trei cromosomi. S-a arătat că trisomia genelor omologe de pe cromosomul 16 (corespunzatoare regiunii 21q22 la om) determină o serie de caracteristici asemănătoare cu cele din sindromul Down (deficite ale proceselor de învăţare, tulburări ale dezvoltării craniofaciale şi modificări neuropatologice asemănătoare celor din boala Alzheimer).

La nivelul regiunii DSCR au fost cartografiate următoarele gene (Hubert et al, 1997, Capone et al, 2001): APP – gena pentru proteina precursor a amiloidului beta şi S100B – gena pentru o proteina de legare a calciului (corelate cu neuropatia de tip Alzheimer la pacienţii cu sindrom Down), SOD1 – gena pentru superoxid dismutaza 1, ETS2 – oncogena ets-2 (implicată în riscul crescut de leucemie la bolnavii cu sindrom Down), CBS – gena pentru cistationin-beta-sintetază (implicata in metabolismul folaţilor) şi CRYA1 – gena pentru proteina alfa a cristalinului (corelată cu frecvenţa crescută a cataractei). Câteva gene candidat pentru retardul mintal în sindromul Down sunt: DYRK1A, ce codifică o protein-kinază (implicată în controlul proliferarii neuroblaştilor), SIM2 (necesară pentru sincronizarea diviziunilor celulare în cursul dezvoltarii cerebrale), GART ce codifică o fosforibozil gliacinamid-formil-transferaza (implicată în dezvoltarea prenataă a cerebelului), PCP4 – proteina tip 4 a celulelor Purkinje (rol în dezvoltarea cerebelului), DSCAM – Down syndrome cell adhesion molecule (considerată a fi implicată în creşterea axonală precum şi o genă candidat pentru defectele congenitale cardiace) şi GRIK1 – receptor pentru glutamat (implicat în funcţia celulelor piramidale ale cortexului). Cu toate progresele realizate, patogenia sindromului Down are încă multe enigme.

Problema esenţială este însă elucidarea etiologiei acestei trisomii frecvente. Vârsta maternă este singurul determinant evident al nedisjuncţiei (vezi capitolele 5.C.1 şi 6.C) dar numai circa 25% din pacienţii cu sindrom Down se nasc din femei peste 35 de ani. Şi totuşi, faptul că 85-90% din cazuri rezultă prin nedisjuncţie maternă (3/4 în meioza I) sugerează intervenţia unui factor de risc ce acţionează la acest nivel (Yoon et al, 1996). S-au emis diferite ipoteze dar nici una nu a fost validată de probe convingătoare. Evidenţierea asocierii între unele polimorfisme ale genelor care codifică enzime implicate în metabolismul folaţilor şi riscul pentru nedisjuncţia cromosomică ce conduce la sindromul Down a fost iniţial demonstrată într-un studiu follow-up (de urmarire), dar nu a putut fi confirmată în alte studii ulterioare.

Sfat genetic.

O problemă frecventă în sfatul genetic este determinarea *riscului naşterii unui copil cu sindrom Down.* Datele actuale arată că riscul depinde în principal de vârsta mamei dar şi de cariotipul celor doi părinţi; vârsta paternă pare să nu aibe nici o influenţă asupra riscului.

Incidenţa medie a sindromului Down în populaţia generală este de 1 la 700 nou-născuţi (Bray et al, 1998). După 35 de ani riscul începe să crească de la 1 la 375 până la 1 la 25 (45 de ani), de aceea s-a ales vârsta de 35 de ani ca o indicaţie de screening ecografic şi biochimic (vezi mai jos) precum şi de diagnostic prenatal (riscul unui fetus cu sindrom Down fiind mai mare decât riscul de avort asociat procedurii – biopsie de vilozităţi coriale sau amniocenteză). O problemă delicată este riscul unui cuplu care are o rudă cu sindrom Down şi cariotip necunoscut; luând în discuţie frecvenţa trisomiei în funcţie de vârsta femeii precum şi posibilitatea unei translocaţii cel mai mare risc calculat este de 1 la 640 (deci aproape de prevalenţa în populaţie) şi el este valabil pentru copilul surorii bolnavului.

Riscul de recurenţă al sindromului Down, după ce s-a născut un astfel de copil, este dependent de tipul de trisomie 21. În trisomia 21 liberă şi omogenă riscul de recurenţă este în medie 1%; pentru femeile sub 30 de ani este puţin mai mare, de circa 1,4% (probabil datorită unor mozaicuri germinale nedepistate); pentru femeile de peste 30 de ani riscul este acelaşi cu cel determinat de vârsta maternă. Riscul de recurenţă este nesemnificativ în trisomiile prin mozaic (<0,1%). În schimb, în cazul trisomiei 21 prin translocaţie Robertsoniană neechilibrată riscul este moderat în translocaţiile între cromosomi neomologi (10-15% dacă mama este purtătoare şi 3-5% dacă tatăl este purtător) şi total (100%) în translocaţiile Robertsoniene între cromosomi 21.

Depistarea prenatală a sindromului Down poate fi efectuată (la orice vârstă dar mai ales după 35 de ani) pe baza unor metode de screening – biochimic şi ecografic, urmate de confirmarea cazurilor suspecte prin realizarea cariotipului.

- Primă metodă de screening este *triplul test* bazat pe determinarea în sângele matern (trimestrul II de sarcină) a α-fetoproteinei (AFP), gonadotrofinei corionice umane (β-hCG) şi a estriolului neconjugat (uE3). Testul este sugestiv pentru sindromul Down când sunt depistate: un nivel crescut al α-fetoproteinei, un nivel crescut al gonadotrofinei corionice umane şi un nivel scăzut al estriolului neconjugat. Acest test are o acurateţe de 70% şi un procent de 5% rezultate fals pozitive. De câţiva ani se foloseşte cvadruplul test, care asociază la triplu test şi dozarea inhibinei A, a cărui sensibilitate este de 81% (Roizen şi Petersen, 2003); de asemenea a fost introdusă analiza unor markeri biochimici de trimestrul I, în special proteina plasmatică A asociată sarcinii – PAPP-A (*Pregnancy Associated Plasmatic Protein-A*) şi fracţia liberă a β-hCG, care cresc acurateţea metodei la 85%, reducându-se totodată şi frecvenţa rezultatelor fals pozitive.
- A doua metodă de screening este reprezentată de *ecografia fetală* (la 11-14 săptămâni de sarcină), principalele semne de alarmă (pentru prezenţa unui făt cu sindrom Down) fiind edemul cefei (translucenţa nucală) în primele luni de sarcină şi scurtarea femurului / humerusului în a doua parte a sarcinii.

Combinarea rezultatelor screeningului ecografic şi biochimic cu vârsta maternă a dus la realizarea unor scheme de predicţie a probabilităţii unui fetus cu sindrom Down. Confirmarea

diagnosticului necesită *examenul citogenetic al amniocitelor* (efectuat în săptămânile 12-16 de sarcină) sau al *celulelor din vilozităţile coriale* (efectuat în săptămânile 9-12 de sarcină).

Îngrijirea copiilor cu sindrom Down ridică numeroase probleme care sunt bine standardizate şi implică diverşi specialişti (informaţii la adresele Internet menţionate în bibliografie). Vom sublinia doar faptul că este necesară o susţinere psihologică continuă şi un sprijin adecvat al părinţilor pentru a face faţă problemelor ridicate de creşterea unui astfel de copil. De asemenea nu trebuie ignorate problemele etice ale sfatului genetic şi diagnosticului prenatal în aceste cazuri (vezi capitolul 20).

1.2 SINDROMUL EDWARS SAU TRISOMIA 18.

Incidenţă. Sindromul Edwards sau trisomia 18 are o incidenţă de aproximativ 1/5000-8000 de naşteri (prevalenţa medie: 1 la 6000 nn), majoritatea cazurilor (80%) fiind de sex feminin; incidenţa la concepţie este mult mai mare dar aproximativ 95% dintre embrionii cu trisomie 18 sunt eliminaţi prin avort.

Simptomatologie. *Nou-născutul* prezintă o greutate mică pentru vârsta gestaţională, hipertonie (!) şi o dismorfie cranio-facială evocatoare: cap alungit (dolicocefalie) cu occiput proeminent, frunte teşită, microretrognatism, urechi jos implantate şi hipoplazice ("*urechi de faun*"). (figura 10.2). Degetele mâinii sunt strâns flectate şi încălecate într-un mod caracteristic: degetele 2 şi 5 acoperă degetele 3 şi 4; Unghiile sunt hipoplazice şi dermatoglifele anormale (exces de arcuri, pliu simian). Sternul este scurt iar piciorul are aspectul de "piolet" (datorită proeminenţei posterioare a calcaneului) şi halucele scurt. Mai există diverse tipuri de hernii sau omfalocel, Frecvent sunt prezente malformaţii congenitale grave: cardiace (90% dintre cazuri), renale, cerebrale, vertebrale. Suspiciunea clinică[4] este susţinută şi de evidenţierea anamnestică a polihidramniosului în cursul sarcinii (la circa 60% din cazuri).

Diagnosticul clinic diferenţial poate fi făcut cu *secvenţa de akinezie fetală sau sindromul Pena-Shokeir tip I* şi cu *artrogripoza distală tip 1*; ambele prezintă contracturi articulare multiple, inclusiv încălecări ale degetelor, dar lipsesc malformaţiile cardiace şi dismorfia facială caracteristică trisomiei 18. De asemenea, prezenţa malformaţiilor viscerale menţionate poate duce uneori la confuzia cu asociaţia CHARGE (vezi capitolul 14).

Analiza citogenetică stabileşte diagnosticul definitiv prin punerea în evidenţă a unei trisomii 18 complete - omogenă (94%) sau în mozaic (5%) sau o trisomie 18 parţială (1%).

Evoluţie şi prognostic. Speranţa de viaţă este foarte mică, aproximativ 90% dintre copii murind în primele 6 luni de viaţă datorită malformaţiilor viscerale grave. Doar 5% supravieţuiesc după vârsta de 1 an, dar prezintă o întârziere severă în dezvoltarea psihomotorie.

Etiologie şi patogenie. Sindromul Edwars este produs de trisomia 18. În trisomiile complete cromosomul adiţional rezultă – în marea majoritate a cazurilor (95%) – prin nedisjuncţie maternă; frecvenţa trisomiei 18 prin nedisjuncţie creşte o dată cu creşterea vârstei materne, dar spre deosebire de trisomia 21, peste 50% dintre erorile de distribuţie se produc în meioza II. Nu s-a localizat încă o regiune critică pe cromosomul 18 care să fie corelată cu fenotipul sindromului Edwards clasic dar, foarte probabil aceasta este localizată pe 18q. Trisomiile parţiale rezultă datorită unei translocaţii sau inversii, care de obicei este moştenită de la unul din părinţi.

Sfat genetic. Se estimează că riscul de recurenţă după naşterea unui copil cu trisomie 18 completă este de 1-2%. În trisomiile parţiale riscul depinde de prezenţa sau absenţa unei translocaţii la părinţi. Depistarea prenatală a trisomiei 18 este posibilă în 60% din cazuri pe baza ecografiei fetale (întârziere în creşterea intrauterină, chişti ai plexurilor coroide, mărirea cisternei magna, prezenţa unei malformaţii majore) şi a triplului test (valori scăzute ale AFP, hCG şi uE3); confirmarea se face însă numai prin efectuarea analizei cromosomice a celulelor

[4] Pentru un neonatolog fără experienţă în dismorfologie este utilă folosirea scorului de diagnostic propus de Marion et al, 1988.

fetale.

1.3 SINDROMUL PATAU SAU TRISOMIA 13.

Incidenţă. Sindromul Patau sau trisomia 13 are o incidenţă de aproximativ 1/10.000-20.000 de naşteri (Wylkie et al. 1994)

Simptomatologie. *Nou-născutul* prezintă – în cazurile tipice – întârziere în creştere, microcefalie cu suturi larg deschise, aplazie cutanată în regiunea vertexului sau occiputului, frunte teşită, microftalmie /anoftalmie, colobom irian, despicături orofaciale, urechi malformate, pumnul strâns cu degetele încălecate, polidactilie postaxială la mâini şi/sau picioare. Aproape constant se întâlnesc malformaţii ale SNC (arhinencefalie sau holoprosencefalie), ale cordului (80%) şi sistemului urogenital.

Diagnosticul clinic este sugerat de triada caracteristică: *despicătură labio-palatină, microftalmie/anoftalmie şi polidactilie postaxială* – observată la aproximativ 70% dintre pacienţi. Absenţa lor parţială face diagnosticul mai dificil deşi sunt şi alte semne care pot evoca trisomia 13 (figura 10.3)(de exemplu, proeminenţa rădăcinii şi vârfului nasului); orice copil cu semne de holoprosencefalie trebuie testat citogenetic pentru trisomie 13. Examinarea postmortem evidenţiază malformaţii caracteristice: holoprosencefalia[5], displazia chistică renală şi pancreatică.

Analiza citogenetică este decisivă pentru diagnostic; în circa 80% din cazuri trisomia 13 este completă, liberă şi omogenă; mozaicurile sunt foarte rare, în schimb în circa 20% de cazuri au fost identificate trisomii complete sau parţiale produse prin translocaţii neechilibrate, de obicei t(13q;14q) sau t(13q;13q), din care jumătate sunt moştenite de la unul dintre părinţi. Necesitatea unor decizii urgente de management a malformaţiilor cardiace la nou născuţi implică un diagnostic citogenetic imediat ; în aceste cazuri sau pentru stabilirea diagnosticului postmortem se poate recurge la analiza FISH interfazică cu sonde pentru cromosomul 13.

Evoluţie şi prognostic. Malformaţiile viscerale multiple şi severe determină decesul a peste 50% din cazuri în prima lună de viaţă. Doar 3% din bolnavi supravieţuiesc peste un an, având un retard mental sever. Supravieţuirea este mai mare în trisomiile parţiale 13q.

Etiologie şi patogenie. Sindromul Patau este produs de trisomia 13. În cazurile produse prin nedisjuncţie, cromosomul 13 suplimentar este de origine maternă şi eroarea de disjuncţie s-a produs în meioza I (Robinson et al, 1996). Încercările de a identifica genele răspunzătoare de semnele cardinale ale trisomiei 13 sunt încă puţine şi neconcludente.

Sfat genetic.

În cazul trisomiilor libere, riscul de recurenţă al afecţiunii este foarte mic (mai mic de 1%) în timp ce pentru translocaţiile Robertsoniene moştenite de la un părinte riscul poate fi de aproximativ 10% pentru translocaţii între cromosomi D neomologi sau chiar 100% în translocaţiile între cromosomii 13. Diagnosticul prenatal de trisomie 13 este sugerat de identificarea întârzierii de creştere şi prezenţa malformaţiilor cerebrale (holoprosencefalia) şi viscerale menţionate; triplul test nu este edificator si numai analiza citogenetică a celulelor fetale va tranşa diagnosticul.

2. SINDROAMELE CU DELEŢII AUTOSOMALE

Studiile citogenetice clasice şi, mai ales, cele care folosesc marcajul în benzi al cromosomilor metafazici au dus la identificarea a numeroase deleţii cromosomice. Dar, în majoritatea cazurilor, numărul de pacienţi depistaţi era mic şi acest lucru a împiedicat definirea unor sindroame asociate deleţiilor. Intr-un număr redus de cazuri a fost, totusi,

[5] Holoprosencefalia este un defect al liniei mediane, afectând creierul (o singură emisferă cerebrală, ventricul cerebral unic, agenezie de corp calos), structurile oculare (microftalmie/ anoftalmie) şi mugurele frontal (modificările fronto-faciale pot fi severe cu ciclopie şi *proboscis* sau hipotelorism şi despicătură velo-palatină mediană sau minore cu hipotelorism şi incisiv superior central unic).

posibilă stabilirea unei corelaţii genotip – fenotip ceea ce a permis definirea câtorva sindroame produse de deleţii cromosomice. Incidenţa lor globală este redusă, circa 1/7000 de naşteri. Cel mai frecvent sunt întâlnite în practică sindromul cri du chat (5p−) şi sindromul Wolf-Hirschhorn (4p−). Înainte de a prezenta succint cele două sindroame vom preciza că deleţiile pot apărea *de novo* sau ca rezultat al unei translocaţii neechilibrate; de aceea este necesară totdeauna efectuarea cariotipului la părinţi, pentru a descoperi dacă unul dintre este sau nu purtător (situaţie în care riscul de recurenţă este crescut).

2.1. SINDROMUL CRI DU CHAT

Sindromul "*cri du chat*" este produs printr-o deleţie importantă a braţului scurt al cromosomului 5. Denumirea acestui sindrom derivă din particularitatea plânsului copiilor afectaţi, asemănător cu mieunatul de pisică (datorat unei anomalii a laringelui).

Incidenţa bolii este de circa 1/50000 de naşteri, dar prevalenţa sindromului la copii cu retard mental sever este de aproximativ 1%.

Simptomatologie. La sugar, semnele clinice sunt: plâns caracteristic, dismorfie cranio-facială cu microcefalie, facies rotund, hipertelorism, epicantus, urechi jos înserate, uneori cu tuberculi preauriculari, micrognaţie (figura 10.4). Particularitatea plânsului începe să se atenueze după vârsta de 2 ani, îngreunând diagnosticul clinic, mai ales pentru că unele din semnele menţionate se modifică sau se atenuează. Pacienţii prezintă un retard mental sever şi au deseori malformaţii cardiace şi genito-urinare.

Analiza citogenetică relevă deleţia 5p- dar mărimea segmentului deletat variază la diferiţi pacienţi.

Evoluţie şi prognostic. Afecţiunea evoluează cu un retard mental sever iar supravieţuirea este variabilă

Etiologie şi patogenie. Sindromul cri du chat este produs de monosomia parţială 5p- fiind întotdeauna implicată banda 5p15. Genele implicate în fenotipul sindromului nu au fost identificate; se ştie doar că majoritatea semnelor fenotipice sunt determinate de haploinsuficienţa unor gene din subbanda 5p15.2 iar hipoplazia laringiană ce produce plânsul caracteristic apare când deleţia interesează subbanda **5p15.3**. Majoritatea cazurilor sunt sporadice, doar circa 15% sunt urmaşii unui părinte purtător al unei translocaţii echilibrate.

Sfat genetic. Riscul este minim pentru deleţiile *de novo* şi variabil atunci când unul din părinţi are o translocaţie (vezi capitolul 9.C.3).

2.2. SINDROMUL WOLF-HIRSCHHORN

Sindromul Wolf-Hirschhorn, determinat de monosomia 4p-, este o anomalie rară, cu o incidenţă de circa 1/50.000 de naşteri.

Simptomatologie. Boala este caracterizată prin: hipotrofie staturo-ponderală marcată, microcefalie şi o dismorfie facială caracteristică: hipertelorismul, arcadele sprâncenare proeminente şi rădăcina nazală lărgită dau feţei un aspect comparat cu o "*cască de luptător grec*") (figura 10.5); frecvent urechile sunt anormale (jos inserate, helix plat, sinus preauricular) şi există malformaţii cardiace grave; retardul mental este constant şi sever.

Analiza citogenetică. Deleţia 4p- poate fi identificată uneori pe cromosomii metafazici dar suspiciunea clinică implică folosirea tehnicilor de înaltă rezoluţie şi FISH. Regiunea critică, a cărei deleţie produce fenotipul caracteristic este localizată în regiunea **4p16.** Se recomandă întotdeauna analiza cromosomică a părinţilor

Evoluţie şi prognostic Speranţa de viaţă este limitată, 1/3 din cazuri murind în primul an de viaţă.

Sfat genetic. Numeroase cazuri sunt sporadice şi riscul de recurenţă este foarte mic, dar uneori deleţia este consecinţa segregării unei translocaţii parentale şi riscul de recurenţă creşte.

3. SINDROAMELE CU MICRODELEŢII ŞI MICRODUPLICAŢII CROMOSOMICE

Mai multe sindroame dismorfice, care au fost iniţial definite clinic, s-au dovedit a fi produse de o deleţie cromosomică mică (sub 4Mb), dificil sau imposibil de observat prin tehnicile convenţionale; aceste deleţii submicroscopice sau microdeleţii pot fi evidenţiate fie prin tehnicile de analiză cromosomică de înaltă rezoluţie fie prin FISH, folosind sonde specifice segementului respectiv[6] (vezi capitolul 2.D.3).

Tabelul 10.2 Sindroame produse prin microdeleţii sau microduplicaţii cromosomice

Sindrom	Tip rearanjament Localizare	Gene identificate	Fenotip
Williams	del(7)(q11.23)	Elastină, sintaxină, LIMK, RFC2, WSCR1	Dismorfie facială caracteristică, stenoză aortică supravalvulară, laxitate articulară, hipercalcemie, hipostatură, retard mental, profil cognitiv şi psihic particular
Langer-Giedion (triho-rino-falangian)	del(8)(q23-q24)	EIF3S3, RAD21, osteoprotegerina,	Facies particular, păr rar, nas bulbos, anomalii ale degete exostoze cartilaginoase, retard mental
WAGR	del(11)(p13)	PAX6, WT1	Tumoră **W**ilms, **A**niridie, malformaţii **G**enito-urinare, **R**etard mental
Beckwith-Wiedemann	dup(11)(p15.5) (5% cazuri)[1]	IGF2, CDKN1C	Dismorfie cranio-facială, macroglosie, defecte ale peretelui abdominal, macrosomie, visceromegalie
Prader Willi	del(15)(q11-q13) cromosom patern (75% cazuri)[1]	SNRPN, necdina	Hipotonie neonatală, dismorfie cranio-facială caracteristică, obezitate, hipogonadism, retard mental moderat, tulburări de comportament.
Angelman	del(15)(q11-q13) cromosom matern (70% cazuri)[1]	UBE3A	Microcefalie, retard mental sever, tulburări de mers şi echilibru, absenţa vorbirii, tulburări caracteristice de comportament.
Rubinstein-Taybi	del(16)(p13.3) (20% cazuri)[1]	CREBBP	Dismorfie cranio-facială particulară, police şi haluce lăţit, malformaţii cardio-vasculare, retard mental
Miller-Diecker	del(17)(p13.3)	LIS1, ABR, 14-3-3-epsilon, CRK, PRP8 MYO1C, SKIP, PITPNA, SCARF1, RILP,SERPINF1	Retard mintal sever şi tulburări neurologice – secundare lisencefaliei, dimorfie facială caracteristică
Smith-Magenis	del(17)(p11.2)	RAI1, NT5M, SGN3	Retard mental sever, tulburări de somn, comportament automutilant, dismorfie facială
Alagille	del(20)(p11-p12)	JAG1	Dismorfie facială, stenoză arteră pulmonară,anomalii vertebrale, colestază hepatică
Velo-cardio-facial /DiGeorge	del(22)(q11.2) (85% cazuri) del(10)(p13) (15% cazuri)	TUPLE1, GSCL HIRA, ş.a	Despicătură sau insuficienţă velo-palatină, , malformaţii cardiace cono-truncale, dismorfie facială caracteristică, hipoplazie timus şi paratiroide (hipocalcemie)
Cat-eye	dup(22)(q11)	CECR7	Colobom irian si/sau coroidian, despicatura palatina, malformatii cardiace, renale, hernii, atrezie anala.
DMD, CGD, RP, hipoplazie suprarenală	del(X)(q21)	DMD, CGD,RP	Distrofie musculară Duchenne, boală granulomatoasă cronică (CGD), retinită pigmentară (RP), insuficienţă suprarenaliană
Azoospermie	del(Y)(q11.23)	AZFa, AZFb, AZFc	infertilitate

[1] Sindromul poate fi produs şi prin alte mecanisme (de ex., disomie uniparentală, mutaţii)

Studiile moleculare au arătat că punctele de ruptură sunt localizate în secvenţe repetitive scurte, identice, care flanchează (încadrează) un anumit segment cromosomic. Prin împerecherea greşită a acestor secvenţe din cromosomii omologi şi crossing over inegal („recombinare omologă nealelică”) (vezi figura 5.19) rezultă deleţii sau duplicaţii ale

[6] Examenul clinic este esenţial pentru alegerea sondei deoarece trebuie să orienteze diagnosticul spre un anumit sindrom.

segmentului respectiv („aneusomie segmentară"). Aşa cum am arătat în capitolul 6.B.1.3, recombinarea omologă nealelică sau inegală este consecinţa arhitecturii speciale a genomului şi reprezintă un mecanism major de producere a unor „boli genomice" (prin pierderea sau duplicaţia unei /unor gene) (vezi caseta 6.1); în funcţie de mărimea segementului implicat rezultă boli mendeliene, sindroame cu microdeleţii sau microduplicaţii, aberaţii cromosomice mari.

Fenotipul sindroamelor cu microdeleţie este de obicei determinat de haploinsuficienţa mai multor gene învecinate, situate în segementul deletat (figura 10.6); de aceea pentru denumirea acestor sindroame se mai utilizează termenul de **sindroame ale genelor contigue.** Spre exemplu în sindromul Williams în segmentul deletat din regiunea 7q11.23 se află gena elastinei (ELN), gena pentru factorul de replicare 2 (RFC2), gena pentru kinaza tip 1 cu domeniu LIM (LIMK1) – a căror haploinsuficienţă determină modificările ţesutului conjunctiv (inclusiv anomaliile vasculare), tulburările de conducere nervoasă şi profilul psiho-comportamental – caracteristice sindromului Williams. Un alt exemplu, ce demonstrează poate mai clar ideea de fenotip „agregat", este microdeleţia Xp21 ce afectează genele DMD, CGD, RP care fiecare produce prin mutaţie o boală monogenică distinctă.

În regiunea cromosomică implicată în sindroamele genelor contigue s-au identificat trei categorii de gene:

- *gene dominante*; prin absenţa genei se produce o haploinsuficienţă ce determină un anumit caracter fenotipic; de exemplu, absenţa genei dominante PAX6 în microdeleţia 11p13 produce aniridie, particularitate clinică a sindromului WAGR;
- *gene recesive*; apariţia caracterului fenotipic este posibilă doar în situaţia în care absenţa genei se asociază cu o mutaţie inactivatoare a alelei localizată pe cromosomul normal; de exemplu, absenţa genei recesive WT1, secundară unei microdeleţii 11p13, determină apariţia unei tumori Wilms şi a unor anomalii genitale, doar în situaţia în care pe celălalt cromosom 11 gena WT1 a suferit o mutaţie;
- *gene cu amprentare genetică*; fenotipul este secundar instalării unei nulisomii funcţionale sau a unei disomii funcţionale a unei gene ce prezintă amprentare genetică şi a cărui status funcţional normal este monoalelic; de exemplu, în sindroamele Prader-Willi şi Angelaman prin disomie uniparentală 15q11-q12, fenotipul este consecinţa unei nulisomiii funcţionale maternă, respectiv paternă; pe de altă parte, în sindromul Beckwith-Wiedemann, prin disomie uniparentală 11p15 paternă, gena IGF2 are activitate bialelică, ceea ce conduce la creşterea exagerată, caracteristică sindromului.

2.1 SINDROMUL VELO-CARDIO-FACIAL.

Dintre multiplele entităţi cuprinse în tabelul 10.2 vom prezenta mai pe larg sindromul velo-cardio-facial cel mai frecvent întâlnit în practică

Sindromul velo-cardio-facial (SVCF) reprezintă un spectru fenotipic continuu, larg şi variabil, produs în majoritatea cazurilor prin **micro-deleţia 22q11.2**. Acest spectrum include: hipoplazia sau aplazia timusului (deficite imune) şi a glandelor paratiroide (hipocalcemie), anomalii cardiace conotruncale, dismorfie facială sugestivă, despicătură palatină sau insuficienţă velo-palatină (vorbire hipernazală), anomalii reno-urinare, anomalii scheletice, întârziere în dezvoltarea psihomotorie şi tulburări psihice, dificultăţi de învăţare şi altele. Unele din aceste manifestări au fost decrise ca entităţi distincte, cu denumiri diferite: *sindromul DiGeorge, sindromul velo-facial, sindromul anomalii conotruncale-faţă, sindromul velo-cardio-facial*; ulterior a devenit evidentă suprapunerea fenotipică parţială a acestor entităţi.

Pentru denumirea acestui spectru fenotipic, ce include mai multe entităţi clinice, s-a propus un acronim - **CATCH-22** - pe baza caracteristicilor clinice şi genetice (Cardiac anomalies, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia, 22-cromosomul afectat). Această denumire, utilă pentru rememorarea caracteristicilor clinice, nu a fost bine acceptată deoarece are, în limba engleză, o conotaţie negativă. S-a sugerat că soluţia cea mai bună ar fi un termen compus **sindrom DiGeorge/ Velo-cardio-facial,** care are avantajul că păstrează numele principalelor sindroame componente. Probabil că această opţiune este realistă dar pentru frecvenţa mare a SVCF (comparativ cu sindromul DiGeorge)(SDG) precum şi faptul că depăşind perioada primei copilării pacienţii etichetaţi iniţial cu SDG au un aspect

caracteristic de SVCF mulţi autori preferă termenul, mai simplu, de **sindrom velo-cardio-facial** considerând pe bună dreptate ca SDG este o formă severă a SVCF.

Incidenţă. Estimările actuale ale SVCF (confirmat prin tehnici moleculare) sunt cuprinse între 1:2000 şi 1:4000 nn, fiind astfel *una din cele mai frecvente boli cromosomice,* încă puţin diagnosticată în practica medicală. SVCF este cel mai frecvent sindrom asociat cu depicătură palatină (8% din copiii cu DP) sau cu malformaţii cardiace (5% din nou-născuţii cu anomalii cardiace, 40% din tetralogiile Fallot).

Manifestări clinice. SVCF se caracterizează printr-un spectru larg şi variabil (ca intensitate şi vârstă de debut) de manifestări fenotipice.

Malformaţiile cardiace sunt frecvente în SVCF (75-80%) şi reprezintă deseori primul semn de diagnostic. Prezenţa lor nu este însă obligatorie iar gravitatea lor este diferită. Cel mai frecvent se întâlnesc malformaţiile conotruncale: tetralogia Fallot, arc aortic întrerupt, defect septal conoventricular, stenoză/atrezie de pulmonară şi trunchi arterial. Aceasta impune evaluarea clinică completă a acestor cazuri pentru identificarea altor anomalii şi apoi testarea genetică.

Dismorfia cranio-facială nu este totdeauna evidentă la sugari şi devine mai pronunţată o dată cu creşterea vârstei: microcefalie, faţa lungă, uneori asimetrică (la plâns) sau flască, prezintă ariile malare şterse, nasul lung şi proeminent, retrognatism. (figura 10.7)

Anomaliile palatului sunt frecvente (60-85%) dar gama de modificări variază de la secvenţa Robin cu despicătură palatină evidentă şi până la integritate structurală a palatului dar cu grade diferite de insuficienţă velofaringiană, ce determină refluarea lichidelor pe nas în timpul sugerii, înghiţitului, precum şi vorbirea nasonală.

Anomalii endocrine şi imunologice. Hipocalcemia neonatală (manifestă prin convulsii, tremor, rigiditate), consecinţa unui hipoparatiroidism congenital, poate fi cel mai precoce şi unicul semn la sugar în formele medii de SVCF. Aplazia timică (şi secundar marea susceptibilitate la infecţii grave, letale) este un semn cardinal pentru forma DiGeorge a SVCF (10% cazuri) dar hipolazia timusului şi forme variate, combinate, dar moderate de imunodeficienţă (a numărului /funcţiei celulelor T) sunt comune în SVCF, mai ales la sugari şi la copii mici. Aceasta impune o evaluare imunologică atentă a copiilor suspecţi de SVCF.

În SVCF se mai întâlnesc: statura mică (33%), anomalii musculo-scheletice (60%), anomalii uro-genitale (10%), anomalii neurologice.

Dezvoltarea psihomotorie şi în special dezvoltarea limbajului este întârziată. Un retard mintal uşor sau moderat este prezent la 40% restul având dificultăţi şcolare importante. Copiii cu SVCF pot avea tulburări de comportament variabile, de la timid şi închis în sine până la neinhibat şi hiperactiv, iar la 10-22% din adolescenţii şi adulţii cu SVCF se întâlnesc tulburări psihiatrice majore.

Diagnosticul clinic de SVCF nu este uşor deoarece sindromul prezintă un spectru larg şi variabil de manifestări fenotipice; pacienţii pot pot manifesta forma gravă, deseori letală (datorită malformaţiilor cardiace şi/sau deficienţelor imune) a sindromului DiGeorge, fenotipuri intermediare (ca în SVCF clasic) sau numai tulburări uşoare de dezvoltare şi anomalii faciale subtile sau vorbire hipernazală cu hipoparatiroidism tranzitoriu. Un alt element ce trebuie subliniat este faptul că unele caractere clasice ale VCFS sunt dependente de vârstă (aspectul facial tipic poate să nu fie evident în primul an de viaţă, tulburările de vorbire sau învăţare se observă mai târziu; vârful nasului lat/bulbos este evident la tineri şi la adulţi) iar altele (dismorfie facială) sunt mai subiective. De aceea sindromul VCFS ar putea fi luat în discuţie la noi-născuţi/ sugari cu anomalii cardiace cono-truncale şi/sau secvenţă Robin dar şi la copii mai mari cu întârzieri în dezvoltare şi anomalii faciale sau ORL, dar fără semnele cardinale ale VCFS.

Diagnosticul diferenţial se va face cu alte sindroame care prezintă elemente comune cu SVCF: tricho-rhino-falangian, Langer-Giedion, Stickler, cerebro-costo-mandibular, alcool fetal şi distrofia miotonică.

Diagnosticul citogenetic molecular este diagnosticul de certitudine**.** Deleţia 22q11 este deobicei prea mică pentru a fi identificată prin cariotipul de rutină. In aceste cazuri

microdeleţia poate fi demonstrată prin FISH, pe metafaze cromosomice, cu sonde pentru 22q11[7]. Dacă analiza cromosomică sau proba FISH evidenţiază deleţia 22q11 atunci *vor fi investigaţi ambii părinţi***,** deoarece în 10-15% din cazurile de SVCF deleţia va fi prezentă la unul din părinţi (exceptând cazurile rare de mozaicism germinal).

Evoluţie şi prognostic. Circa 8% din pacienţi decedează, de obicei în primele 6 luni, în special prin malformaţii cardiace sau din cauza deficitele imune severe. Un procent variabil din pacienţi au un retard mental uşor dar majoritatea prezintă dificultăţi de învăţare. Nu există nici un element predictiv valabil al expresiei şi evoluţiei clinice dar există posibilităţi eficace de intervenţie medicală, psihologică sau educaţională care pot corecta multe din manifestările bolii.

Etiopatogenie. Studiile recente privind etiopatogenia SVCF au demonstrat că majoritatea pacienţilor (80-85%) cu SVCF (dar nu toţi!) au *deleţii de mărime variabilă* în regiunea 22q11.2. La circa 80-90% din pacienţi deleţia se produce *de novo,* este *sporadică*; restul pacienţilor *moştenesc deleţia* de la unul din părinţi, mai frecvent de la mamă, care pot avea semne fenotipice minore. Deşi mărimea deleţiei la persoanele afectate este variabilă nu există nici o corelaţie între mărimea deleţiei şi fenotip; cea mai mică regiune a ADN care este comun deletată (regiunea critică minimă) are 480 Kb lungime; se presupune că această regiune conţine gena/ genele care determină fenotipul SVCF; au fost identificate genele GSCL, CTP, CLTD, HIRA, TMVCF şi TUPLE1[8], din care GSCL şi HIRA au fost implicate în dezvoltarea embrionară la şoarece sau pui de găină iar TUPLE1 este exprimată în perioadele critice ale dezvoltării inimii şi vaselor mari;

Circa 15% din pacienţi cu fenotip cert de SVCF nu au o deleţie detectabilă cu markerii folosiţi; explicaţiile posibile ar fi: o deleţie foarte mică în regiunea critică, nedetectabilă cu sondele moleculare actuale; o mutaţie punctiformă a uneia din genele din această regiune; o mutaţie sau microdeleţie în alt cromosom (heterogenitate genetică); o fenocopie produsă de agenţi teratogeni .

Concomitent cu eforturile de elucidare a etiologiei VCFS s-au realizat studii care au încercat descifrarea patogeniei sindromului. Se ştie că mai multe ţesuturi şi organe afectate la pacienţii cu VCFS derivă embriologic din arcurile şi pungile faringiene III şi IV. S-a presupus că anomaliile feţei, cordului, timusului şi glandelor paratiroide observate în SVCF sunt produse printr-un *defect în diferenţierea şi/sau migrarea celulelor crestei neurale craniale.* Totuşi, o parte din caracterele clinice asociate SVCF nu pot fi explicate numai printr-un defect al celulelor crestei neurale. Marea sa variabilitate fenotipică în condiţiile unor deleţii identice ca dimensiuni presupune intervenţia altor mecanisme. Etiopatogenia VCFS nu va fi înţeleasă decât atunci când vor fi identificate în regiunea critică a deleţiei genele ce produc semnele majore ale SVCF, inclusiv diferenţierea / migrarea celulelor din creasta neurală cefalică. Identificarea unei mutaţii într-una din genele candidat la pacenţii cu VCFS fără deleţie ar fi un argument important.

Sfatul genetic. Riscul de recurenţă este nesemnificativ în microdeleţiile *de novo* ; în schimb prezenţa deleţiei la unul din părinţi face ca riscul de recurenţă să fie de 50%.

B. SINDROAMELE CU ANOMALII ALE CROMOSOMILOR SEXUALI

Anomaliile cromosomilor sexuali – numerice şi structurale, omogene sau în mozaic – sunt printre cele mai frecvente boli genetice, având o incidenţă globală de 1 la 400 nou-născuţi de sex masculin şi 1 la 650 nou născuţi de sex feminin (Robinson et al, 1998). Fenotipurile asociate cu aceste anomalii cromosomice sunt, în general, mai puţin severe comparativ cu sindroamele autosomale datorită

[7] În cazurile negative se vor folosi sonde pentru 10q21, un alt locus ce poate da un fenotip VCF

[8] GSCL – genă din clasa "goosecoid" a factorilor de transcripţie cu homeodomeniu implicată în dezvoltarea embrionară; CTP – proteina mitocondrială de transport a citraţilor; CLTD – gena D pentru lanţul greu al clatrinei, cu rol în transducţia semnalelor; HIRA – se exprimă în cursul dezvoltării embrionare în regiunea cefalică şi mugurii membrelor; TMVCF – codifică o proteină transmembranară cu funcţie necunoscută; TUPLE1 – codifcă un factor transcripţional.

inactivării cromosomului X şi numărului mic de gene de pe cromosomul Y, fenomene ce reduc consecinţele dezechilibrului cromosomic. Dezvoltarea fizică şi psihică sunt de obicei relativ puţin afectate; în schimb anomaliile cromosomilor sexuali se asociază frecvent cu disgenezii gonadice şi sterilitate. De aceea, orice întârziere în dezvoltarea pubertară, amenoreea primară sau secundară precoce, azoospermia şi sterilitatea reprezintă indicaţii clinice importante pentru studiul cromosomilor.

1. SINDROMUL TURNER

Sindromul Turner este determinat de monosomia X, completă sau parţială, singura monosomie viabilă la specia umană.

Incidenţă. Boala afectează aproximativ 1/2500-1/3000 din nou-născuţii de sex feminin dar se estimează că aproximativ 2% din concepţiile recunoscute clinic prezintă monosomie X care este letală în 95% din cazuri, embrionii fiind avortaţi (Sybert,2001)(vezi etiopatogenia).

Simptomatologie. Este important de subliniat că sindromul Turner tipic poate fi identificat (în circa 2/3 din cazuri) la naştere sau înainte de pubertate, deci la vârste ce permit aplicarea unei terapii hormonale de supleere, destul de eficace.

O treime din cazuri pot fi diagnosticate clinic în *perioada neonatală* prin următoarele semne evocatoare: copil de sex feminin, cu talie şi greutate mai mică pentru o vârstă gestaţională normală, limfedem (dur, nedureros, tranzitoriu) pe faţa dorsală a mâinilor şi picioarelor[9], gât scurt, cu exces de piele pe ceafă şi/sau *pterygium coli* (pliu cutanat pe feţele laterale ale gâtului) şi distanţă intermamelonară mare (figura 10.8).

O altă treime din cazuri pot fi identificate *prepubertar*; suspiciunea clinică se bazează pe existenţa unui întârzieri majore de creştere, ce devine evidentă după 2-3 ani şi atinge -3 DS faţă de medie la 10 ani. La aceasta se poate adăuga gât scurt, palmat, cu inserţia joasă a părului pe ceafă şi torace lat cu mameloane îndepărtate.

Postpubertar diagnosticul clinic este sugerat de triada: hipostatură, amenoree primară, caractere sexuale secundare feminine deficitare.

- Hipostatura este semnul cardinal al sindromului Turner. În absenţa tratamentului cu hormon de creştere, înălţimea pacientelor cu sindrom Turner se încadrează în intervalul 130-150 cm, dependent de talia părinţilor; cu un tratament cu STH, iniţiat înainte de 10 ani, se câştigă 6-10 cm la talia finală.
- Amenoreea primară (absenţa ciclurilor menstruale) şi deficitul de sexualizare sunt secundare disgeneziei gonadice, produsă prin degenerescenţa ovocitelor (ce începe în viaţa fetală) şi înlocuirea ovarelor cu bandelete fibroase. Rareori, degenerescenţa este incompletă (mai ales la persoane cu monosomie X în mozaic), ceea ce conduce la o dezvoltare pubertară aproape normală şi la apariţia de cicluri ovulatorii neregulate; totuşi, şi la aceste cazuri, menopauza este precoce, iar probabilitatea de a avea o sarcină este infimă. Deoarece ovarele disgenetice nu produc ovule, pacientele cu sindrom Turner au sterilitate primară şi definitivă.
- Absenţa secreţiei hormonilor sexuali feminini (estrogeni şi progesteron) induce amenoree primară, dezvoltare insuficientă a caracterelor sexuale secundare feminine (glande mamare puţin dezvoltate, pilozitate axilară absentă, pilozitate pubiană redusă) şi creşterea FSH şi LH. Organele genitale externe au aspect infantil, iar uterul este hipoplazic. Terapia de supleere cu estrogeni (începută prepubertar) corijează deficitul de sexualizare fenotipică.

În sindromul Turner există o dismorfie cranio-facială necaracteristică, manifestată prin: aspect matur al feţei, facies triunghiular, epicantus, fante palpebrale antimongoloide, palat înalt, anomalii dentare, urechi proeminente. Alte semne ce pot fi identificate la pacientele cu sindrom Turner sunt: diametrul biacromial mai mare decât cel bitrohanterian, torace plat („în scut") cu distanţă intermamelonară crescută, *cubitus valgus* (axul antebraţului face un unghi obtuz deschis în afară cu axul humerusului), scurtarea metacarpianului IV, unghii convexe hipoplazice, prezenţa a numeroşi nevi pigmentari. În 30-40% din cazuri pot fi identificate

[9] Reprezintă persistenţa unui limfedem generalizat apărut în viaţa fetală şi vizibil uneori şi sub formă de *hygroma colli cysticum* - o acumulare de lichid seros în dilataţii limfatice ale gâtului

malformaţii congenitale renale sau cardiace (coarctaţie de aortă, prolaps de valvă mitrală, bicuspidie aortică). Dermatoglifele sunt anormale: triradius axial în poziţie distală (t' sau t") şi suma crestelor digitale (SCD) mai mare decât media la sexul feminin.

Inteligenţa este normală sau la limita inferioară a normalului, cu o scădere în special a percepţiei spaţiale şi a capacităţii de abstractizare. Pacientele pot avea deficite auditive prin anomalii ale urechii interne.

Diagnosticul clinic diferenţial se face în copilărie cu sindromul Noonan: hipostatură, facies caracteristic, gât scurt, palmat, deformaţii toracice/sternale, malformaţii congenitale de cord (în special stenoză pulmonară, cardiomiopatie hipertrofică sau DSV); la pubertate se vor lua în discuţie alte cauze de întârziere pubertară.

Analiza citogenetică este decisivă pentru diagnostic.

- *Testul cromatinei X* este negativ în cazurile cu monosomie omogenă şi pozitiv, dar cu valori reduse, în cazul monosomiei în mozaic sau în monosomiile parţiale prin anomalii structurale. În prezenţa unor isocromosomi X de braţ scurt, a unor deleţii sau cromosomi inelari X dimensiunea corpusculului Barr este mai mică (aproximativ 0,7μm) decât valoarea normală, în timp ce prezenţa unui isocromosom X de braţ lung se asociază cu un corpuscul Barr mai mare (aproximativ 1,2μm). Considerăm că testul cromatinei X este un test screening simplu şi ieftin.
- *Examenul cromosomic* este esenţial pentru stabilirea diagnosticului de certitudine. În circa 50-60% din cazuri cariotipul evidenţiază o monosomie X omogenă; în 25% din cazuri se întâlnesc difertite tipuri de mozaicuri[10], ce includ obligatoriu o linie cu monosomie X totală sau parţială (cel mai frecvent 45,X/46,XX -15% cazuri); în restul cazurilor se găsesc anomalii de structură ale cromosomului X: isocromosomi X de braţ lung sau de braţ scurt, deleţii Xp sau Xq, cromosomi inelari.

Evoluţie şi prognostic. În perioada copilăriei probleme deosebite pun copiii cu sindrom Turner care au malformaţii cardiace sau renale ce pot face diferite complicaţii. Depistarea precoce a bolnavelor permite folosirea unei terapii eficace cu hormon de creştere şi, prepubertar, cu estrogeni. Ulterior, pot să apară, mai frecvent decât în populaţia generală, tiroidite autoimune, HTA, obezitate şi diabet zaharat noninsulino-dependent. Inserţia socială este de obicei bună iar viaţa de familie este posibilă.

Etiopatogenie. Studii recente au arătat că circa 2% din sarcinile recunoscute clinic prezintă monosomie X. Cauzele care determină lipsa frecventă a unui gonosom nu se cunosc. Eliminarea ca avorturi spontane a peste 95% din embrionii cu monosomie X se datorează probabil haploinsuficienţei unor gene importante de pe cromosomul X care scapă inactivării. Nu se cunoaşte încă care este explicaţia faptului că deşi letalitatea in utero a monosomiei X este mare, nou născuţii cu aceeaşi anomalie supravieţuiesc mulţi ani fără probleme vitale deosebite. Ipoteza conform căreia majoritatea lor sunt mozaicuri cromosomice nedetectate nu a fost confirmată; se pare că naşterea copiilor cu monosomie X omogenă este corelată cu prezenţa unei placente diploide.

Dintre cazurile de nou născuţi cu monosomie X omogenă, 50-70% au origine paternă, fiind consecinţa unei nedisjuncţii sau întârzieri anafazice în meioza tatălui, care duce la formarea de gameţi lipsiţi de gonosom.

Patogenia sindromului Turner este în curs de elucidare. Analizele moleculare au indicat că absenţa braţului scurt al cromosomului X determină hipostatura (probabil prin haploinsuficienţa genei SHOX[11], localizată în regiunea pseudoautosomală a braţului scurt al cromosomului X) şi de malformaţiile congenitale, în timp ce deleţia braţului lung al cromosomului X produce disfuncţia gonadică.

Sfatul genetic. Riscul de recurenţă al sindromului Turner este uşor crescut în raport cu riscul existent în populaţia generală. Diagnosticul prenatal este posibil numai atunci când se

---

[10] Analizele moleculare (FISH, PCR) au evidenţiat – în unele studii recente – o frecvenţă de 70% a mozaicurilor; datele trebuiesc însă a fi confirmate.

[11] Gena SHOX este una din genele implicate în dezvoltarea organismului.

identifică semne ecografice de alarmă: hygroma cysticum, hidrops fetalis, malformaţii congenitale cardiace sau renale dar diagnosticul unui fetus Turner ridică probleme etice majore privind continuarea sau întreruperea sarcinii.

2. SINDROMUL KLINEFELTER

Sindromul Klinefelter este consecinţa fenotipică a trisomiei gonosomale XXY sau a altor polisomii XY; un fenotip asemănător au şi bărbaţii XX.

Incidenţă. Sindromul Klinefelter are o incidenţă mai mare de 1 la 1000 nou-născuţi de sex masculin (probabil 1/600) dar multe cazuri nu sunt diagnosticate din cauza modificărilor fenotipice reduse. Reprezintă principala cauză de hipogonadism la bărbat.

Simptomatologie. Diagnosticul clinic al acestei afecţiuni este posibil doar postpubertar. În copilărie sindromul Klinefelter poate fi *suspectat* în prezenţa unei staturi înalte, a aspectului gracil şi a dificultăţilor de adaptare şcolară. La pubertate talia creşte, pe seama membrelor inferioare[12].Testiculii rămân mici (sub 3 cm lungime x 1,5 cm lăţime, deci un volum < de 3ml), fermi, nedureroşi la palpare – datorită disgeneziei gonadice (nedezvoltarea celulelor germinale, hialinizarea tubilor seminiferi) şi degenerescenţa Leydigiană, determină absenţa spermatogenezei şi a secreţiei de testosteron). Nivelul scăzut al testosteronului se asociază cu valori crescute ale hormonilor gonadotropi (FSH şi LH).

În absenţa testosteronului, *caracterele sexuale secundare sunt slab dezvoltate*[13]: pilozitatea facială, axilară şi tronculară sunt absente, pilozitatea pubiană este redusă, corpul are conformaţie de tip feminin, vocea este înaltă, iar adipozitatea are o dispoziţie de tip ginoid. Penisul se dezvoltă, de obicei, normal („disociaţie peno-orhitică) şi funcţia sexuală este normală. În circa 30% din cazuri apare ginecomastia (dezvoltarea glandelor mamare la un individ de sex masculin)[14] (figura 10.9).

Sterilitatea din sindromul Klinefelter este primară şi definitivă, pacienţii cu această afecţiune reprezentând aproximativ 10% din bărbaţii cu azoospermie. Rareori, la pacienţii cu mozaic cromosomic, fertilitatea este păstrată, existând posibilitatea apariţiei de descendenţi.

Dezvoltarea intelectuală este aproape normală, coeficientul intelectual fiind la limita inferioară a normalului sau peste aceasta. 70% din pacienţii cu sindrom Klinefelter prezintă tulburări de învăţare, determinate de dislexie. Deficitul intelectual este corelat cu prezenţa unui număr crescut de cromosomi X. Inserţia socială este de obicei dificilă.

Diagnosticul clinic diferenţial se face în special cu sindromul Kallman care asociază hipogonadismul cu anosmia.

Analiza citogenetică pune diagnosticul de certitudine. Testul cromatinei sexuale X şi testul cromatinei sexuale Y sunt pozitive. Cariotipul relevă în 85% din cazuri o trisomie 47,XXY liberă omogenă. În circa 12-13% din cazuri sunt prezente diferite mozaicuri cromosomice (cel mai frecvent: 46,XY/47,XXY) şi mai rar alte cariotipiri 48,XXXY, 49,XXXXY; prezenţa unui număr mai mare de cromosomi X se asociază cu creşterea severităţii modificărilor dismorfice şi a retardului mental. Rareori se găseşte un cariotip 46,XX („bărbaţii XX", la care un mic segment de Yp este translocat pe un cromosom X).

Evoluţie şi prognostic. Speranţa de viaţă este normală. Pot apărea probleme de adaptare socială şi tulburări de comportament.

Etiopatogenie. Sindromul Klinefelter este produs de trisomia XXY sau poli-XY.

---

[12] aspect determinat de închiderea târzie a cartilajelor de creştere în absenţa testosteronului.

[13] Administrarea de hormoni sexuali masculini, cu scopul de inducere a dezvoltării caracterelor sexuale secundare masculine, are efecte benefice.

[14] Ginecomastia este consecinţa secreţiei de către glandele suprarenale (în prezenţa nivelurilor crescute de FSH şi LH) a unei cantităţi crescute de androgeni aromatizabili, transformaţi în ficat în estrogeni, care produc stimularea celulelor mamare. Apariţia ginecomastiei este asociată cu un risc crescut de cancer mamar, persoanele cu sindrom Klinefelter reprezentând circa 3% din toate cazurile de cancer mamar la bărbat.

Aceaste anomalii cromosomice produc disgenezia testiculară dar mecanismul prin care cromosomii X suplimentari determină acest efect nu se cunoaşte. Trisomia XXY omogenă are în 60% din cazuri origine paternă (obligatoriu în meioza I) şi în 40% din cazuri origine maternă (nedisjuncţiei în meioza I – 75% - sau meioza II). Trisomia în mozaic este secundară unei nedisjuncţii cromatidiene în mitozele unui embrion cu sex genetic masculin sau pierderii unui cromosom X la un zigot XXY.

Sfat genetic. Riscul de recurenţă nu este mai mare decât în populaţia generală, fiind dependent de vârsta maternă numai în circa 30% din cazuri.

3. TRISOMIA X ŞI ALTE POLISOMII X

Trisomia X sau sindromul triplo X afectează 1/1000 de nou-născuţi de sex feminin şi nu produce modificări majore caracteristice.

Diagnosticul clinic, în general dificil, este sugerat de următoarele semne: talia deasupra mediei şi coeficientul de inteligenţă la limita inferioară a normalului (tulburări de vorbire, dificultăţi de învăţare, probleme educaţionale), dismorfie facială necaracteristică (facies rotund, cu fante palpebrale oblice în sus şi înafară), tulburări menstruale (cicluri neregulate, menopauză precoce) şi de reproducere (sterilitate sau avorturi spontane repetate). Aceste modificări sunt inconstante şi de obicei femeile sunt fertile, putând avea copii normali sau copii cu trisomie X sau trisomie XXY.

Explorările citogenetice precizează diagnosticul. Cromatina X este pozitivă, fiind evidenţiate celule cu unul sau doi corpusculi Barr. Cariotipul poate releva o trisomie X omogenă sau în mozaic. În 90% din cazuri, cromosomul X suplimentar provine dintr-o nedisjuncţie în meioza maternă (de obicei este afectată meioza I). La aceste cazuri a fost observată o asociere cu vârsta maternă crescută în momentul concepţiei.

La pacientele cu polisomii X intelectul este mult mai sever afectat şi de obicei există manifestări dismorfice şi sterilitate. Cariotipul evidenţiază o tetrasomie X sau pentasomie X, omogenă sau, mai frecvent, în mozaic.

4. SINDROMUL 47,XYY

Trisomia XYY este relativ frecventă, dar diagnosticul clinic este rareori stabilit datorită modificărilor fenotipice minore pe care le determină. Incidenţa afecţiunii este de 1/1000 de nou-născuţi de sex masculin.

Fenotipul se caracterizează prin talie înaltă, dezvoltare intelectuală normală, dar coeficientul de inteligenţă este cu 10-15 puncte mai mic decât cel al persoanelor înrudite. Prezintă deseori întârziere în dezvoltarea limbajului, dificultăţi de învăţare (prin dificultăţi de citire şi deficit de atenţie), probleme educaţionale, hiperactivitate şi impulsivitate (agresivitatea şi comportamentul aberant, descrise iniţial în literatură, sunt rare).

Diagnosticul se pune numai prin analize citogenetice: testul cromatinei Y pozitiv, cu doi corpusculi F, iar cariotipul este 47,XYY. Toate cazurile sunt consecinţa unei nedisjuncţii în meioza II paternă.

De regulă persoanele cu trisomie XYY au fertilitate normală, dar uneori pot fi depistate tulburări de spermatogeneză, care induc hipofertilitate. Deşi, teoretic pot forma gameţi anormali, riscul unor descendenţi XXY sau XXX nu este mai mare decât în populaţia generală. Diagnosticul prenatal este de obicei întâmplător dar evidenţierea unui făt 47,XYY pune probleme dificile pentru păstrarea sau întreruperea sarcinii.

C. TULBURĂRILE DE REPRODUCERE DE CAUZĂ CROMOSOMICĂ

Circa 10% din cupluri nu pot avea o sarcină, deşi îşi doresc acest lucru, după un an de viaţă sexuală normală şi fără anticoncepţionale. Aceste cupluri sunt definite ca sterile

(infertile); infertilitatea afectează în proporţii egale bărbatul sau femeia. Alte 10-20% din sarcini sunt pierdute ca avorturi spontane iar la 1% din cupluri se produc avorturi repetate. Aceste date ne arată că tulburările de reproducere sunt o problemă medicală frecventă şi importantă.

Cauzele tulburărilor de reproducere sunt multiple: genetice, malformative, endocrine, imunologice sau de mediu. Abordarea medicală implică acţiuni complexe din care nu pot lipsi abordarea şi evaluarea genetică deoarece, aşa cum vom vedea, într-o proporţie semnificativă de cazuri intervin factori genetici.

1. STERILITATEA FEMININĂ

Sterilitatea la femei poate avea cauze multiple (tabelul 10.3): disgenezie sau disfuncţie ovariană (40%), obstrucţie tubară (40%) şi anomalii sau boli ce afectează tractul reproductiv (vagin, cervix, uter) (20%) (Willson, 2000).

Tabel 10.3. Cauzele de sterilitate la femei (după Williamson şi Ellias, 1992)

Categorie	Boli	Manifestări
Disgenezie ovariană		
Anomalii cromosomice	Sindrom Turner (45,X)	Talie mică, gât palmat, caractere sexuale secundare reduse, amenoree primară.
Anomalii congenitale	Disgenezie gonadică 46,XX (233300; 233400)	Disgenezie ovariană izolată cu sau fără surditate
Disfuncţie ovariană		
Tulburări în sinteza hormonilor sexuali.	Hiperplazia congenitală suprarenală Tip I (201710)	Exces de androgeni; deficit de cortizol şi aldosteron.
Ovare displazice.	Sindromul Stein-Levinthal.	Ovare polichistice, hirsutism.
Alte boli endocrine.	Deficienţă hipofizară.	Deficienţă în FSH, LH.
Boli sistemice, afecţiuni cronice	Disfuncţie cerebrală, infecţii, autoimunitate	Perturbarea stimulării hipofizare a ovarelor.
Anomalii ale tractului reproductiv		
Uterine	Uter bicorn, bipartit	Modificarea anatomiei uterine.
	Multe sindroame plurimalformative	Sindromul McKusick/Kaufman (236700): anomalii cardiace, renale, digitale.
	Asociaţia MURCS	Anomalii uterine, renale, ale coloanei cervicale.
	Secvenţa Rokitansky	Anomalii uterine, renale.
Col uterin, vagin	Aplazie cervix, vagin septat	Anomalii cervix sau vaginale
Inflamaţii ale tractului reproductiv		
Infecţii	Gonoree, sifilis, chlamidia.	Obstrucţie tubară.
Endometrioze	Ţesut endometrial în afara uterului	Menstruaţii anormale, dureri pelvine

Anomaliile cromosomice care afectează structura şi funcţia ovariană sunt reprezentate în primul rând de sindromul Turner (inclusiv disgenezia gonadică mixtă 45,X/45,XY) şi, mai rar, alte aneuploidii (unele cazuri de trisomie X sau polisomie X), deleţii sau translocaţii X-autosom (vezi Layman, 2002). Regiunile critice corelate cu disgenezia ovariană sunt POF 1 (Xq26-q28) şi POF 2 (Xq13.3-q22) în care se găsesc probabil gene necesare dezvoltării normale a ovarelor (de ex., gena *DIAPH2* în regiunea POF2). Alte boli genetice şi anomalii congenitale menţionate în tabelul 10.3 au un determinism monogenic sau multifactorial .

2. STERILITATEA MASCULINĂ

Cauzele care produc sterilitate masculină (tabel 10.4) sunt reprezentate, în ordinea frecvenţei, de către varicocel (dilataţii anormale ale venelor cordonului spermatic ce pot comprima canalele deferente) (40%), disgenezie testiculară (14%), tulburări endocrine (9%),

diferite alte obstrucţii ale canalelor deferente (8%), testiculi necoborâţi congenital (criptorhidie, 4%), inflamaţii.

Tabel 10.4. Cauzele de sterilitate la bărbaţi (după Williamson şi Ellias, 1992)

Categorie	Boli	Manifestări
Disgenezie testiculară		
Anomalii cromosomice	Sindrom Klinefelter (47,XXY)	Talie înaltă, caractere sexuale secundare reduse, testiculi mici
Masculinizare inadecvată (pseudohermafroditism masculin)	Disgenezie gonadică 46,XY (prin mutaţii ale genei SRY)	Fenotip feminin
	Testicul feminizant (313700)	Fenotip feminin, deficit receptori de androgeni
Anomalii congenitale	Multe sindroame cromosomice şi mendeliene	Criptorhidism, micropenis, spermatogeneză anormală
Disfuncţie testiculară		
Tulburări în sinteza hormonilor sexuali.	Sindromul Reifenstein (313700)	Deficit parţial de receptori de androgeni.
	Hipoplazii congenitale suprarenală	Deficit de androgeni, deficit de cortizol, aldosteron.
Alte anomalii endocrine	Sindromul Kallman (308700)	Disfuncţie hipofizară, anosmie.
Agenţi din mediu.	Oreion, hipertermie (testiculi intra-abdominali) radiaţii	Testiculi hipoplazici, blocarea spermatogenezei.
Spermatogeneză anormală	Sindromul Kartagener (244400).	Azoospermie, dilataţii bronşice, situs inversus.
	Anomalii cromosomice structurale	Oligo(azoo)spermie
Anomalii ale tractului reproductiv		
Canale deferente	Varicocel.	Dilataţii varicoase ale venelor cordonului spermatic
	Fibroză chistică	Absenţa canalelor deferente, afectare pulmonară şi gastro-intestinală.
Uretră	Multe sindroame malformative cu hipospadias sau stenoză	Sindromul McKusick-Kauffman: anomalii cardiace, renale, digitale
Inflamaţii ale tractului reproductiv		
Infecţii	Gonoree, sifilis, chlamidia, TBC.	Obstrucţie canale deferente.

Cauzele genetice sunt relativ frecvente în sterilitatea masculină. Anomaliile cromosomice constituţionale afectează 15% dintre subiecţii cu azoospermie şi 6% dintre subiecţii cu oligospermie severă (<10 milioane spermatozoizi/ml). Alte sindroame sau malformaţii ce afectează structura testiculului sau căile genitale au un determinism monogenic sau multifactorial.

Anomaliile cromosomice de număr care afectează structura şi funcţia testiculară sunt reprezentate în special de sindromul Klinefelter (47,XXY). Bărbaţii prezintă azoospermie iar biopsia testiculară relevă atrezia celulelor germinale, sclerohialinizarea tubilor seminiferi şi atrofia celulelor Leydig; mecanismul prin care trisomia XXY produce aceste modificări nu se cunoaşte, dar poate fi implicat un efect de dozaj genic, indus de prezenţa a doi cromosomi X. Singurele trisomii autosomale care pot ajunge la vârsta reproductivă sunt trisomia 21 şi trisomia 8, ambele fiind asociate cu sterilitate masculină. Un rol aparte în determinismul infertiltăţii la bărbat îl au anomaliile de structură neechilibrate ale cromosomului Y şi anomaliile de structură echilibrate ale autosomilor.

Anomaliile neechilibrate ale cromosomului Y nu modifică fenotipul, deoarece acest cromosom conţine foarte puţine gene somatice. În schimb, ele afectează testiculii, datorită absenţei uneia sau mai multor regiuni ale cromosomului Y, implicate în determinismul sexual şi/sau controlul spermatogenezei. Cele mai frecvente anomalii sunt microdeleţiile Yq. Majoritatea sunt *de novo* şi au fost identificate la 3-18% dintre bărbaţii cu azoospermie nonobstructivă şi la 5-10% dintre bărbaţii cu oligospermie severă. Evidenţierea prezenţei

microdeleţiilor cromosomului Y poate fi realizată prin tehnica FISH (folosind sonde specifice locilor implicaţi) sau utilizând tehnica PCR.

Prezenţa unei microdeleţii a cromosomului Y determină modificări anatomopatologice testiculare, care variază de la absenţa completă a celulelor germinale (*Sertoli cell-only syndrome* - SCOS) până la blocarea spermatogenezei. Analizele moleculare au relevat că regiunea critică în microdeleţiile cromosomului Y este localizată la nivelul benzii Yq11.23 şi a fost denumită *AZF* (*AZoospermia Factor*) (figura 10.10). Regiunea AZF a fost împărţită în trei domenii notate: AZFa, AZFb şi AZFc. Deleţiile subregiunii AZFa sunt rare (1-5%) dar severe, fiind asociate cu SCOS. Studiile moleculare au arătat că genele cel mai probabil implicate sunt *USP9Y* şi *DBY* . Deleţiile AZFb (16%) şi AZFc (60%) sunt mai frecvente, fiind asociate cu blocarea spermatogenezei. La nivelul regiunii AZFb a fost identificată gena *RBMY* care face parte dintr-un complex multigenic de 20-50 gene/pseudogene. La nivelul regiunii AZFc a fost identificată gena *DAZ*. Aceasta este prezentă în 4-6 copii, codifică o proteină care se fixează pe ARN şi este exprimată doar în celulele germinale testiculare.

Anomaliile cromosomice structurale echilibrate, reprezentate de inversii şi translocaţii (reciproce, Robertsoniene, inserţii,) produc sterilitate masculină prin afectarea formării veziculei sexuale, datorită prezenţei cromosomului(ilor) derivativ(i).

Inversiile cromosomilor 1, 2, 3, 5, 6, 7 şi 9 au fost asociate cu sterilitatea masculină, incidenţa lor fiind de 8 ori mai mare decât la persoanele normale.

Translocaţiile reciproce şi inserţiile se întâlnesc la 1% din sterilităţile masculine producând blocarea spermatogenezei prin modificarea configuraţiei meiotice normale. Translocaţiile Robertsoniene dintre cromosomii acrocentrici sunt implicate în circa 0,7% dintre cazurile cu sterilitate masculină, cea mai frecventă fiind translocaţia rob(13;14). Afectarea fertilităţii este însă variabilă de la o spermatogeneză cvasinormală până la blocarea aproape completă a spermatogenezei. Acest aspect este dovedit de existenţa unor cazuri familiale, în care membri diferiţi ai aceleeaşi familii, purtători de translocaţie, sunt unii sterili, unii cu hipofertilitate, iar alţii prezintă fertilitate normală.

Datele prezentate arată clar necesitatea explorării citogenetice a oricărui bărbat cu spermogramă anormală la care o etiologie infecţioasă este eliminată. Să ne reamintim (vezi capitolul 6.C.3) că 1 din 232 nou născuţi are o anomalie cromosomică echilibrată care poate produce o tulburare de reproducere.

3. AVORTURI SPONTANE Ş NOU-NĂSCUŢII MORŢI.

Aşa cum am menţionat, 90 % din cupluri sunt fertile dar nu sunt „scutite" de alte tulburări de reproducere. În 10-20% din cazuri produsul de concepţie se poate elimina sub forma unui avort (în primele 28 săptămâni de sarcină) sau a unui nou-născut mort (după săptămâna 28); avorturile se subîmpart în precoce (0–8 săptămâni) şi tardive (9-27 săptămâni) Etiologia pierderilor de sarcină este complexă, implicând factori genetici, malformativi, endocrini, placentari, materni, imunologici (anticorpi antisfingolipide)(tabelul 10.5). Anomaliile cromosomice fetale au o pondere variabilă dar întotdeauna importantă.

Numeroase studii au arătat că *avorturile spontane precoce* (AP) implică în peste 50% din cazuri eliminarea unui embrion cu anomalii cromosomice. Frecvenţa anomaliilor cromosomice depinde de morfologia avortului. Din acest punct de vedere Kalousek (1997) deosebeşte trei categorii:

- AP cu creştere dezorganizată (58-70% din toate AP) au o incidenţă mai mare a anomaliilor cromosomice;
- AP cu morfologie normală sunt produse mai ales de anomalii de fază luteală sau anomalii uterine;
- AP cu defecte focale au un procent mare de anomalii cromosomice deşi atunci când se observă malformaţii unice trebuie invocat mai ales un determinism multifactorial.

Avorturile tardive produse după săptămâna 9 de sarcină prezintă o frecvenţă de numai 4-7% anomalii cromosomice, de obicei monosomie X, triploidii şi trisomii autosomale comune. Triploidiile se asociază cu anomalii placentare (vilozităţile coriale devin chistice) de tip *molă hidatiformă completă sau parţială*.

Tabel 10.5 Tipuri de pierderi de sarcină
(după Kalousek, 1997)

Tip (frecvenţă, morfologie)	**A.C (%)**	**Etiologie**	**Implicaţii**
Avorturi precoce (AP) (0 – 8 spt.)	50		De obicei RR scăzut
Creştere dezorganizată (GD) (58-70% din AP)	60	Trisomii (27%), Poliploidii (10%), Monosomii X (9%), Rearanjări (2%)	Studiul cromosomilor parentali când sunt ≥ 3 AP sau atunci când embrionul are o anomalie de structură.
GD1 (sac, fără embrion)	73		
GD2 (embrion, fără RP)	52		
GD3 (embrion, RP)	37		
GD4 (embrion, disproporţii)			
Morfologie normală (16-34% AP)	20	Defect de fază luteală Anomalii uterine	RR scăzut
Defecte focale (5-18% din AP) defecte de tub neural, membre, despicături palatine	92	Monosomie X, Triploidie, Trisomii	În cazul în care cariotipul este normal este posibil un RR mendelian sau multifactorial
Avorturi tardive (9 – 27 spt)	4-7	Malformaţii majore Monosomie X, triploidie Anomalii placentare	RR multifactorial RR mic RR mic
Nou născuţi morţi (>28 spt)	5-10	Boli materne (40%) (+abuz nicotină, alcool, droguri) Dezlipire de placentă (15%) Malformaţii majore (15%) IUGR (11%) Sindroame mendeliene Sindroame cromosomice	Deobicei RR mic RR scăzut RR multifactorial 0-50% 0-50% RR mic
Decese neonatale (0 – 4 spt după naştere) (sunt determinate de cauze prenatale)	?2-5	Prematuritate Malformaţii congenitale Unice Sindroame Infecţii (produc corio-amniotite) Boli materne Hidrops fetal	RR mic RR multifactorial 0 – 50% RR mic RR mic 0 – 50%

AP – avort precoce; RP – pigment retinian (“ochi”); AC – anomalii cromosomice; RR – risc de recurenţă pentru făt anormal şi/sau avort

La produşii de avort au fost identificate toate tipurile de anomalii cromosomice neechilibrate, care în ordinea frecvenţei sunt: trisomii, poliploidii, monosomia X, anomalii structurale neechilibrate. Se întâlnesc toate tipurile de trisomii, cu excepţia trisomiei 1; cea mai frecventă este trisomia 16. Monosomia X este cea mai frecventă anomalie individuală.

Avorturile repetate (recurente) (≥ 3) sunt prezente la 0,8-1% din toate cuplurile şi cauzele genetice (anomalii cromosomice, de obicei structurale neechilibrate, şi boli monogenice letale) se află pe locul trei după boli endocrine şi malformaţii sau boli uterine. Translocaţiile neechilibrate (5% din avorturile recurente) pot fi consecinţa segregării unei translocaţii echilibrate la unul din părinţi; în această situaţie, riscurile unei femei purtătoare sunt: 80% avort, 4% nou născut malformat, 16% nou născut normal. În situaţia în care părinţii sunt normali cromosomic riscurile empirice de recurenţă sunt: 24% după două avorturi spontane consecutive şi 36% după trei avorturi. Deci probabilitatea de a finaliza o sarcină prin naşterea unui copil este mai mare de 60%.

Nou născuţii morţi sunt rezultatul unor cauze multiple şi variate: boli materne (inclusiv consumul de nicotină, alcool, droguri), IUGR (întârziere în creşterea intrauterină -

datorită anomaliilor placentare, infecţiilor fetale, sindroamelor genetice), malformaţii majore, sindroame mendeliene, sindroame cromosomice (5-10%), decolare de placentă.

Orice pierdere a unei sarcini dorite este un eveniment traumatizant, care implică un sprijin psihologic atent. Întrebările cu care se confruntă medicul sunt: de ce s-a produs? Ce risc există la sarcinile următoare? Analiza aprofundată a cauzelor de către o echipă specializată şi dotată corespunzător permite răspunsuri adecvate. Cert este că intervenţia factorilor genetici este importantă şi, funcţie de determinismul monogenic, multifactorial sau cromosomic, riscurile variază de la 50% la 3% (tabelul 10.5). La orice cuplu confruntat cu mai multe pierderi de sarcină (avorturi şi/sau nou născuţi morţi) se va face analiza cromosomică chiar dacă numai 2-5% din aceste cupluri au, la unul din parteneri, o anomalie cromosomică echilibrată.

BIBLIOGRAFIE CAPITOL 10

INTERNET

1. Alianţa grupurilor de sprijin (suport) pentru bolnavii cu afecţiuni genetice: http://www.geneticalliance.org
2. Asociaţia Sindromul Klinefelter : http://www.genet.org/KS
3. Congresul national al sindromului Down (USA): http://www.members.carol.net/~ndsc
4. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : (http://geneclinics.org)
5. Organizaţii internaţionale pentru sindromul Down: http://www.nas.com/downsyn/org.html
6. Organizaţie naţională pentru boli rare (NORD): http://www.pcnet.com/~orphan/
7. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omin/
8. Orphanet – bază de date pentru boli genetice(http://orphanet.infobiogen.fr)
9. POSSUM (http://possum.net.au/)
10. Programul HELIX (sfat şi teste genetice) al Universităţii şi Spitalului de copii din Washington: http://www.healthlinks.washington.edu/helix/
11. Societatea naţională (USA) sindromul Down: http://www.ndss.org
12. Societate Sindromul Turner (USA) : http://www.turner-syndrome-us.org

Bibliografie specifică selectivă

1. American Academy of Pediatrics Committee on Genetics – *Health supervision for children with Turner syndrome* – Pediatrics 1995, 96: 1166-1173.
2. American Academy of Pediatrics Committee on Genetics – *Health supervision for children with Down syndrome* – Pediatrics 2001, 107: 442-449.
3. Antonelli a, Gandini L, Petrinelli P - *Chromosomal alterations and male infertility* - J.Endocrinol.Invest. 2000,23:677-683
4. Bray I, Wright DE, Davies C, Hook EB – *Joint estimation of Down syndrome risk and ascertainment rates: A meta-analysis of nine published data sets* – Prenatal Diag. 1998;18:9-20
5. Capone GT – *Down syndrome: advances in molecular biology and the neurosciences* – J. Dev. Behav. Pediatr. 2001, 22: 40-59.
6. Carey JC. – *Trisomy 18 and trisomy 13 syndromes* – in "Management of Genetic Syndromes" ed. Cassidy SB, Allanson JE. Wiley-Liss, New York, 2001, 417-436.
7. Emanuel BS, Shaikh TH – *Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease* – Nat. Rev. Genet. 2001, 2: 791-800.
8. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P et al – *Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome* – Am. J. Hum. Genet. 2000, 67: 623-630.
9. Hubert RS, Mutton S, Chen X-N et al – *BAC and PAC contigs covering 3,5 Mb of the Down syndrome congenital heart disease region between D21S55 and MX1 on chromosome 21*– Genomics, 1997;41:218-226

10. Hunter AG – *Down syndrome* – in "Management of Genetic Syndromes" ed. Cassidy SB, Allanson JE. Wiley-Liss, New York, 2001, 103-129.
11. Kalousek DK. - *Pathology of abortion: the embryo and the previabil fetus* – In Gilbert-Barnes E, ed. Potter's Pathology of the fetus and infant, Mosby, StLouis, 1997, pp 106-128.
12. Layman LC. – *Human gene mutations causing infertility* - J Med Genet 2002; 39:153-161.
13. Levy B, Dunn TM, Kern JH, Hirschhorn K, Kardon NB – *Delineation of the dup5q phenotype by molecular cytogenetic analysis in a patient with dup5q/del 5p (cri du chat)* – Am. J. Med. Genet. 2002, 108:192-197.
14. Linsday EA – *Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome* – Nat. Rev. Genet. 2001, 2: 858-868.
15. Ogata T., Matsuo N. – *Turner syndrome and female sex chromosome aberrations* – Hum.Gent. 1995;95:607-629.
16. Pryor L, Kent M, Muallem A. – *Microdeletions in the Y chromosome of infertile man* – N.Engl.J.Med., 1997;336:534-539.
17. Regan L. – *Recurrent miscarriage* – BMJ 1991;302:543-544
18. Robinson A, Bender BG, Linden M. – *Prenatal diagnosis of sex chromosome abnormalities* – in "Genetic disorders and fetus", 4th edition, Milunsky A ed., Baltimore, John Hopkins University Press, 1998, p.249-368.
19. Roizen N.J, Patterson D – *Down's syndrome* – Lancet, 2003, 361: 1281-1289.
20. Saenger P. – *Tuner's syndrome* – Curr.Ther.Endocrinol.Metab. 1997;6:239-243.
21. Thielemans BJ, Spiessens C, Hooghe TD - *Genetic abnormalities and male infertility. A comprehensive review* Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol. 1998;81:217-225.
22. Torf CP, Christianson RE – *Anomalies in Down syndrome individuals in a large population based registry* – Am.J.Med.Genet. 1998;77:431-438
23. Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, Selicorni A, Butte C, Memo L, Capovilla G, Neri G – *Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2* – Am. J. Hum. Genet. 2003, 72: 590-597.
24. Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL et al – *Advanced maternal age and risk of Down syndrome characterised by meiotic stage of the chromosome errors* – Am.J.Med. Genet. 1996;58:628-633

CAPITOLUL 11

BOLILE MONOGENICE

Bolile monogenice sunt afecţiuni produse de mutaţii ale unei singure gene; aceste mutaţii se transmit în succesiunea generaţiilor după tipul mendelian: autosomal dominant, autosomal recesiv sau legat de X. De aceea, bolile monogenice mai sunt numite **boli mendeliene**[1] şi sunt repertoriate în catalogul „*Mendelian Inheritance of Man*" (MIM), editat de Profesorul Victor McKusick (ultima ediţie, a 12-a, a fost tipărită în 1998); vesiunea Online – OMIM – este actualizată continuu şi accesibilă în întreaga lume (vezi caseta 5.4). OMIM cuprinde circa 14.000 de fenotipuri şi gene, dintre care aproximativ 10.000 de intrări corespund unor boli monogenice.

Bolile monogenice reprezintă una dintre categoriile majore ale bolilor genetice, atât prin număr şi frecvenţă, cât şi prin consecinţele importante asupra morbidităţii şi mortalităţii, mai ales la copil.

> Majoritatea bolilor monogenice devin manifeste clinic în perioada neonatală sau în copilărie. Doar aproximativ 10% din bolile monogenice cunoscute debutează clinic după pubertate şi doar aproximativ 1% dintre ele după sfârşitul perioadei reproductive.

Deşi cele mai multe dintre aceste boli sunt rare, luate împreună ele realizează o pondere importantă în cadrul morbidităţii şi mortalităţii la copii. Frecvenţa globală a bolilor monogenice la copii este de circa 2-3%, iar ponderea lor printre cauzelor de spitalizare este de circa 6-8%.

Atunci când se cunoaşte defectul primar al unei boli monogenice, adică mutaţia la nivel genic, precum şi consecinţele la nivelul proteinei codificate, se utilizează termenul de **boală moleculară**. In prezent cel puţin 1500 de boli monogenice pot fi încadrate în această categorie a bolilor moleculare, iar cercetările în curs de desfăşurare vor permite, fără îndoială, descifrarea bazelor moleculare ale tuturor bolilor monogenice.

Studiul bolilor moleculare a produs o adevărată revoluţie în medicină. El permite *o reclasificare a bolilor* în funcţie de mutaţiile cauzatoare şi mecanismele patogenice. Această acţiune – dublată de posibilitatea unui diagnostic molecular, deseori prenatal sau presimptomatic – are consecinţe majore pentru asigurarea unui sfat genetic mai precis, sau pentru selecţia celor mai adecvate metode de tratament. Elucidarea bazelor moleculare ale bolilor monogenice este însă utilă nu numai pentru abordarea specifică a acestor afecţiuni, ci şi pentru descifrarea mecanismelor moleculare care asigură desfăşurarea proceselor biologice normale şi, implicit, funcţionarea adecvată a organismului uman. Se poate afirma că am intrat într-o nouă etapă a dezvoltării medicinii, denumită pe drept cuvânt **medicină moleculară** (vezi capitolul 1.D.3). De aceea, prezentarea unor date generale despre bazele moleculare şi biochimice ale bolilor monogenice, ca model pentru bazele moleculare ale tuturor bolilor umane, este nu numai benefică dar şi necesară.

A. BAZELE MOLECULARE ŞI BIOCHIMICE ALE BOLILOR MONOGENICE.

[1] Caracteristicile generale şi criteriile de transmitere ale fiecăreia dintre aceste subgrupe de boli au fost prezentate în capitolul 5

Medicina moleculară încearcă să explice mecanismele prin care anumită modificare genetică determină un fenotip clinic particular. In capitolul 6 au fost prezentate natura şi mecanismele de producere a mutaţiilor; acest subcapitol este concentrat mai ales asupra înţelegerii consecinţelor pe care mutaţiile le pot avea asupra cantităţii şi funcţiilor unui produs genic şi asupra explicării cauzelor pentru care aceste modificări sunt sau nu patogenice asupra unei anumite celule, aflată într-un stadiu particular de dezvoltare.

Se pot deosebi patru categorii de efecte ale mutaţiilor asupra funcţiilor proteinelor codificate: mutaţii cu pierderea functiei, mutaţii cu câştig de functie, mutaţii cu dobândirea unei funcţii noi şi mutaţii care conduc la expresia anormală temporal (expresie heterocronică) sau spaţial (expresie ectopică) a unei proteine.

O clasificare mai puţin utilizată în prezent împarte alelele mutante în: *alele nule* sau *amorfe* (care nu produc nici o proteină), *alele hipomorfe* (care produc o cantitate redusă de proteină sau o proteină cu activitate scăzută), *alele hipermorfe* (care codifică o cantitatea crescută de proteină sau o proteină cu activitate accentuată), *alele neomorfe* (care codifică proteine cu o activitate nouă) şi *alele antimorfe* (care antagonizează activitatea alelei normale).

Trebuie precizat că nu există o asociere preferenţială între unele gene şi una din categoriile de mutaţii prezentate mai sus. Ca urmare, una şi aceeaşi genă poate suferi atât mutaţii cu pierderea funcţiei cât şi mutaţii cu câştig de funcţie, iar consecinţele acestor mutaţii se pot exprima prin producerea unor boli diferite.

Un asemenea exemplu este acela al mutaţiilor genei RET. Această genă codifică un receptor transmembranar pentru factorul de creştere neuronal derivat din celulele gliale (GDNF). Diferite mutaţii cu pierderea funcţiei proteinei RET au ca rezultat producerea **bolii Hirschsprung** (OMIM 142623), caracterizată prin absenţa neuronilor postganglionari enterici care conduce la megacolon congenital şi constipaţie cronică. Alte mutaţii specifice au însă ca efect câştig de funcţie, determinând o reactivitate exagerată a receptorului faţă de ligand sau chiar activarea sa în absenţa GDNF. Aceste mutaţii au ca rezultat boli genetice diferite precum **carcinoamele tiroidiene** medulare familiale sau **neoplaziile endocrine** multiple tip 2. Există în sfârşit unele mutaţii cu sens greşit care pot determina apariţia simultană a acestor boli, ceea ce sugerează ca aceeaşi mutaţie poate avea efecte diferite în ţesuturi diferite.

Multe boli monogenice asociază o *variabilitate clinică* considerabilă, chiar în interiorul aceleiaşi familii în care membrii afectaţi sunt purtători ai aceleiaşi mutaţii. Acest fapt sugerează intervenţia altor gene nealele, care modifică fenotipul clinic (*gene modificatoare*), sau a unor factori din mediul înconjurător.

Un exemplu de genă modificatoare este cel al genei PLA2G2A care codifică fosfolipaza A2. Diferite variante alelice ale acestei gene modifică numărul polipilor adenomatoşi dezvoltaţi la indivizii cu **polipoza adenomatoasă familială** (FAP – OMIM 175100). O altă genă modificatoare, localizată pe cromosomul 19q13.2-13.4, poate influenţa severitatea manifestărilor clinice în fibroza chistică (OMIM 219700).

1. MUTAŢII CU PIERDEREA FUNCŢIEI.

Pierderea funcţiei proteinei codificate de o genă mutantă reprezintă cea mai frecventă modalitate prin care o modificare genetică produce o boală. Există numeroase tipuri de mutaţii care pot reduce sau aboli funcţia unui produs genic (vezi capitolul 6.B.1). Acestea pot fi: deleţii sau inserţii – ce produc schimbarea cadrului de lectură (*"frameshift"*), mutaţii nonsens – care determină sinteza unei proteine trunchiate, mutaţii cu sens greşit (*"missens"*) – ce substituie un aminoacid esenţial pentru activitatea proteinei, mutaţii la nivelul regiunilor reglatoare ale gene.; Uneori se pot produce chiar *modificări epigenetice*, cum ar fi de exemplu atenuarea activităţii genice prin hipermetilarea (şi deci inactivarea) regiunii promotor.

Mutaţiile cu pierderea funcţiei tind să se asocieze, în general, cu o *transmitere recesivă*, deoarece la indivizii heterozigoţi (Na) alela normală este capabilă să asigure singură o cantitate suficientă de proteină funcţională şi, de cele mai multe ori, organismul funcţionează normal doar cu 50% din nivelul de activitate genică.

Există însă unele mutaţii genice, relativ puţine la număr, pentru care o reducere cu 50% a

nivelului de activitate determină apariţia unui fenotip anormal. Asemenea situaţii, desemnate prin termenul de *haploinsuficienţă,* sunt întâlnite în special atunci când proteina codificată este necesară în cantităţi mari (celulele funcţionează în mod normal la nivelul maxim de transcripţie).

Un exemplu este cel al genei pentru elastină ale cărei mutaţii sunt implicate în producerea **stenozei aortice supravalvulare** (OMIM 185500). La indivizii heterozigoţi pentru asemenea mutaţii, majoritatea ţesuturilor bogate în elastină (tegumente, plămâni, vase sanguine) funcţionează normal, dar aorta supravalvulară va suferi un proces de stenozare progresivă care poate necesita corecţia chirurgicală.

Mutaţiile asociate cu un fenomen de haploinsuficienţă tind să se transmită dominant şi asociază un grad crescut de expresivitate variabilă.

In cazul proteinelor care funcţionează ca dimeri (homo- sau heterodimeri) sau în cadrul unor compleze multimerice, mutaţiile cu pierderea funcţiei pot avea drept consecinţă nu numai alterarea activităţii polipeptidului respectiv dar şi a celui produs de alela normală sau chiar de gene nealelice.

Printre exemplele cele mai cunoscute în această categorie sunt mutaţiile genelor pentru colagen care vor fi discutate în subcapitolul următor. Colagenul fibrilar, componenta majoră a ţesutului conjunctiv, este organizat sub forma unor lanţuri polipeptidice triplu helicoidale, fie homotrimerice, fie heterotrimerice. Un polipeptid anormal care va forma un triplu helix cu două polipetide normale va conduce la alterarea activităţii întregului complex; ca urmare, astfel de mutaţii pot reduce semnificativ sub 50% cantitatea de colagen funcţional.

In aceste cazuri se consideră că mutaţiile au *efecte dominant negative*: se păstrează capacitatea de sinteză a unei proteine funcţionale dar cu activitate anormală. Mutaţiile dominant negative vor avea în general consecinţe fenotipice mai severe decât alte mutaţii ale aceloraşi gene care abolesc complet activitatea ei (mutaţii nule) şi se transmit după un model dominant simplu (figura 11.1).

Efectele fenotipice ale mutaţiilor cu pierderea funcţiei depind în mare măsură de *gradul de pierdere a funcţiei* şi deci de nivelul activităţii reziduale a produsului genic. De exemplu, multe substituţii aminoacidice pot avea un efect foarte redus asupra funcţiei proteice, deşi altele pot aboli complet funcţia normală. Mutaţiile cu pierderea funcţiei pot să intereseze una sau ambele alele. In a doua situaţie, indivizii sunt afectaţi dar mutaţiile celor două alele pot fi adeseori diferite – realizând statusul de *heterozigoţi compuşi*. Dacă ambele mutaţii determină pierderea funcţiei, dar în proportii diferite, alelă care are efectul cel mai puţin sever va dicta nivelul de activitate reziduală şi implicit severitatea manifestărilor clinice. Se poate realiza astfel o *recesivitate graduală* în care severitatea fenotipului clinic depinde de nivelul activităţii reziduale

Un exemplu este cel al mutaţiilor care afectează gena pentru hipoxantin-guanin-fosforibozil transferază (HPRT) de pe cromosomul X. Nivelul de activitatea reziduală este bine corelat cu fenotipul clinic al bărbaţilor purtători ai mutaţiei. Astfel, mutaţiile care permit o menţinere a nivelului activităţii enzimatice de peste 60% nu determină nici o simtomatologie clinică, mutaţiile ce reduc nivelul activităţii enzimatice la 1,6-8% determină **gută**, o reducere la 1,4-1,6% asociază **coreoatetoza** şi automutilare, în timp ce mutaţiile ce reduc activitatea enzimatică sub 1,4% determină manifestări clinice de **sindrom Lesch-Nyhan clasic** (OMIM 308000): coreoatetoza, automutilare şi retard mintal.

2. MUTAŢII CU CÂŞTIG DE FUNCŢIE

Mutaţiile pot altera fenotipul clinic nu numai prin reducerea sau pierderea funcţiei, dar şi prin accentuarea funcţiei unor proteine. Acest efect se poate produce fie prin creşterea nivelului de sinteză a proteinei, fie prin intensificărea funcţiei proteinei normale.

- Mutaţiile care *cresc nivelul de expresie* al unei gene şi, ca urmare, cantitatea de proteină funcţională sintetizată, sunt relativ rare. Modul lor de transmitere este dominant. Cea mai frecventă situaţie este aceea a duplicaţiei unor gene, precum gena DAX de pe cromosomul X (care determină inversiune sexuală prin *efect de dozaj* la indivizi 46,XY – OMIM 300018) sau duplicaţia genei pentru mielina periferică – PMP22 – implicată în producerea **sindromului Charcot-Marie-Tooth** tip 1A (degenerescenţa nervoasă periferică – OMIM 118220).

Asemenea mutaţii care conduc la creşterea nivelului unei proteine normale pot fi considerate şi baza moleculară a multora dintre trăsăturile fenotipice în cadrul trisomiilor cromosomice. In plus, acest mecanism este frecvent implicat la nivel somatic, în cadrul fenomenelor de amplificare genică întâlnite în celulele tumorale.

- Mutaţiile care amplifică funcţia normală a unei proteine sunt relativ frecvente printre bolile monogenice cu transmitere dominantă. Astfel, **hemoglobina Kempsey** (substituţia Asp99Asn la nivelul lanţului beta – OMIM 141900.0146) se caracterizează printr-o accentuare a afinităţii pentru oxigen şi, ca urmare, o reducere a nivelului de eliberare a acestuia la nivelul ţesuturilor periferice. Un alt exemplu este cel al **acondroplaziei** (OMIM 100800), boală caracterizată prin hipostatură disproporţionată, în care substituţia unui singur aminoacid în structura FGFR3 (receptorul tip 3 pentru factorul de creştere a fibroblaştilor) determină o activare permanentă a acestui receptor, chiar în absenţa ligandului.

Recunoaşterea bolilor genetice produse prin mutaţii cu câştig de funcţie este foarte importantă deoarece tratamentul acestora diferă în mod esenţial de cel al bolilor produse prin mutaţii cu pierderea funcţiei. In plus, mutaţiile cu câştig de funcţie permit adeseori înţelegerea la nivel fundamental a mecanismelor de reglare a expresiei genice sau a bazelor moleculare ale funcţiei proteinei.

3. MUTAŢII CU DOBÂNDIREA UNEI FUNCŢII NOI

Intr-un număr mic de boli, modificarea unui singur aminoacid din structura unei proteine poate determina dobândirea unei calităţi noi, fără ca funcţia proteinei să să fie în mod obligatoriu modificată. Un exemplu ilustrativ îl reprezintă **alela Pittsburg** a alfa1-antitripsinei (substituţia Met358Arg – OMIM 107400.0026). În mod normal alfa1-antitripsina inhibă elastaza; în schimb, alela mutantă Pittsburg nu mai este activă asupra elastazei dar are capacitatea de a acţiona asupra trombinei, producând o tulburare letală de coagulare. Un alt exemplu de mutaţie cu dobândirea unei funcţii noi îl reprezintă, în oarecare măsură, sicklemia (OMIM 603903). Hemoglobina S îşi păstrează afinitatea normală faţă de oxigen, dar în condiţiile scăderii presiunii parţiale a oxigenului, precipită determinând deformareaîn seceră a eritrocitelor (vezi capitolul 4.B.3).

Cel mai frecvent mecanism care conduce la apariţia unor funcţii noi este întâlnit la nivel somatic, prin remanieri cromosomice care unesc porţiuni funcţionale ale unor gene diferite. Asemenea reasocieri ale exonilor au avut probabil o importanţă deosebită în cursul evoluţiei, permiţând apariţia unor funcţii noi. Cea mai frecventă consecinţă a unor asemenea rearanjamente somatice este însă dezvoltarea unor neoplazii.

4. MUTAŢII ASOCIATE CU EXPRESIA HETEROCRONICĂ SAU ECTOPICĂ

Expresia multor gene este astfel controlată încât să aibă loc într-un moment bine determinat al dezvoltării ontogenetice şi în anumite ţesuturi. Unele mutaţii, localizate la nivelul regiunilor reglatoare ale genelor, determină expresia anormală din punct de vedere temporal sau spaţial a unor gene. Există însă relativ puţine boli monogenice produse prin asemenea mutaţii. Un exemplu sugestiv îl reprezintă **persistenţa ereditară a hemoglobinei fetale** (OMIM 141749), în care mutaţii în regiunile reglatoare ale genelor pentru hemoglobină determină expresia la adult a hemoglobinei gamma, sintetizată în mod normal numai în viaţa fetală şi în perioada neonatală.

Asemenea mutaţii apar însă mult mai frecvent în cadrul cancerelor. Aşa cum va fi prezentat în capitolul 17, protooncogenele sunt gene care promovează proliferarea celulară normală în cursul perioadei de dezvoltare embrionară. Expresia acestor gene în celulele somatice adulte are drept consecinţă proliferarea celulară necontrolată, care va conduce la dezvoltarea neoplaziilor.

B. BOLI MOLECULARE

Aşa cum s-a precizat la începutul acestui capitol, bolile monogenice pentru care sunt descifrate mecanismele moleculare şi biochimice sunt denumite şi boli moleculare. Clasificările bolilor moleculare sunt dificile având în vedere complexitatea mecanismelor patogenice care stau la baza lor. De aceea, o clasificare simplă, dar utilă, împarte bolile moleculare în funcţie de *clasa* din care face parte proteina mutantă.

Proteinele pot fi clasificate în primul rând după *modul lor de expresie* în:

- *proteine "de întreţinere sau menajere"* (*housekeeping*) prezente la nivelul tuturor ţesuturilor, cu rol fundamental în menţinerea structurii şi funcţiilor celulare; la om circa 10.000 – 15.000 de gene codifică asemenea proteine housekeeping, care vor reprezenta circa 90% din cantitatea proteinelor oricărei celule;
- *proteine specializate* prezente numai în anumite ţesuturi, având rol în determinarea caracteristicilor fiecărui ţesut diferenţiat; proteinele specializate reprezintă circa 10% din proteinele celulare

Această clasificare nu este absolută deoarece unele proteine housekeeping pot fi exprimate la nivele mai mari în anumite ţesuturi.

In general, datorită rolului lor major în activitatea tuturor celulelor şi ţesuturilor, mutaţiile genelor housekeeping sunt incompatibile cu supravieţuirea şi vor fi rareori întâlnite drept cauză a unor boli genetice. In unele cazuri însă mutaţiile unor asemenea gene pot determina boli care se manifestă clinic la nivelul acelor ţesuturi în care proteina respectivă este exprimată la un nivel maxim.

Mutaţiile genelor care codifică proteine specializate tind să afecteze în mod particular ţesutul în care acea proteină este exprimată. Uneori însă pot fi afectate secundar şi alte ţesuturi sau organe sau, în mod paradoxal, pot să fie evidente clinic numai simptome la nivelul unor organe în care proteina mutantă nu este exprimată.

Proteinele pot fi clasificate de asemenea, în funcţie de *activitatea* lor, în câteva clase majore: enzime, proteine implicate în transport, proteine structurale, proteine implicate în controlul homeostaziei, proteine implicate în comunicarea intracelulară şi proteine implicate în controlul dezvoltării şi diferenţierii. Delimitarea acestor clase de proteine nu este întotdeuna facilă întrucât multe proteine pot fi implicate adeseori în mai multe activităţi prin intermediul domeniilor lor funcţionale diferite. Considerăm însă utilă o prezentare schematică a unor date generale privind bolile moleculare produse prin mutaţii ale unor asemenea clase de proteine, exemplificate prin intermediul unor afecţiuni cu impact clinic deosebit, prin frecvenţă sau severitatea manifestărilor clinice.

1. BOLI ENZIMATICE (ERORI ÎNNĂSCUTE DE METABOLISM)

Toate procesele metabolice celulare sunt catalizate de către *enzime*. Mutaţiile care modifică eficienţa acestor proteine vor perturba adeseori metabolismul celular până la un nivel care determină apariţia bolii.

Primele boli enzimatice (alcaptonuria, albinismul, cistinuria şi pentozuria) au fost descrise (1902-1908) de către Archibald Garrod, care a demonstrat că aceste enzimopatii sunt transmise ereditar în concordanţă cu legile lui Mendel; astfel, Garrod a introdus mendelismul în medicină şi a formulat conceptul de "*erori înăscute de metabolism*". De atunci au fost descrise peste 350 de boli enzimatice. Cele mai multe dintre ele sunt rare, dar luate împreună ele deţin o pondere importantă în morbiditatea şi mortalitatea atribuite bolilor genetice (după estimările mai vechi, bolile metabolice ar reprezenta 10% din bolile monogenice la copii şi ar avea o frecvenţă

cumulată de 1/2500 nou-născuţi; foarte probabil acestea sunt subestimări ale fenomenului real, datorită dificultăţilor de diagnostic).

Majoritatea bolilor enzimatice sunt determinate de mutaţii cu pierderea funcţiei şi, ca urmare, sunt transmise recesiv, autosomal sau legat de X. Numai indivizii care sunt purtători a două alele mutante (homozigoţi sau heterozigoţi compuşi) vor fi afectaţi. La heterozigoţi (Na), deşi alela mutantă produce o proteină cu activitate enzimatică redusă sau chiar absentă, fenotipul lor nu este alterat deoarece ei vor avea, datorită alelei normale, cel puţin 50% din activitatea enzimatică păstrată. De fapt multe enzime pot să menţină – în condiţii obişnuite – un nivel normal al reacţiei catalizate chiar şi la concentraţii de aproximativ 10% din cele normale (de exemplu hexozaminidaza A).

Deficienţa enzimatică produce un „bloc metabolic“ (figura 11.2) care poate avea următoarele consecinţe:

- *acumularea* (stocarea) substratului (precursorilor); atunci când substratul care se acumulează este o moleculă mică, uşor difuzabilă, precum fenilalanina, ea poate să fie redistribuită uşor în întregul organism şi, ca urmare, manifestările clinice pot fi adeseori sistemice; dimpotrivă, atunci când substratul este o macromoleculă, acesta va rămâne la nivelul ţesutului respectiv şi va determina în special manifestări clinice localizate;
- *devierea* căii metabolice şi sinteza unor produşi toxici;
- *deficitul* unui produs de reacţie (final sau intermediar) sau o combinaţie „deficit şi acumulare“;
- lipsa controlului feed-back datorită absenţei produsului final.

Deficite unor enzime diferite care intervin însă în aceeaşi cale metabolică pot produce manifestări clinice asemănătoare (de exemplu, mucopolizaharidozele). Pe de altă parte, deficitul parţial sau deficitul complet al aceleiaşi enzime poate determina boli diferite (vezi exemplul HPRT amintit anterior).

Toate căile metabolice pot fi afectate prin deficienţe enzimatice. Cititorul interesat va găsi informaţii exhaustive în tratatul *„The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease“* (Scriver CR et al., ed. 8, 2001), în care bolile metabolice sunt grupate pe metabolisme; tabelul 11.1 sintetizează principalele categorii de boli metabolice, exemplificate cu cele mai frecvente şi cunoscute afecţiuni. Informaţii suplimentare preţioase se găsesc şi în capitolul *„Boli genetice de metabolism“* (Paula Grigorescu-Sido) din Tratatul de Pediatrie (ed. E. Ciofu, Carmen Ciofu, 2001) sau se pot obţine prin accesarea OMIM. În ceea ce urmează vom prezenta sintetic doar câteva dintre cele mai frecvente enzimopatii.

Tabelul 11.1. Exemple de boli genetice produse prin deficite enzimatice

Enzima	*Gena*	Localizare cromosomică	*Boala*	*OMIM*
Boli ale metabolismului carbohidraţilor				
Galactozo-1-fosfat uridil transferaza	GALT	9p13	Galactozemia clasică	230400
Fructozo 1,6-bifosfat aldolaza	ALDOB	9q13-q32	Intoleranţa ereditară la fructoză	229600
Fructokinaza	KHK	2p23	Fructozuria	229800
Lactaza	LCT	2q21	Hipolactazia adultului	223100
Glucokinaza	GCK	7p13	Diabetul MODY (maturity onset diabet of youth)	606321
Glucoza-6-fosfataza	G6PC	17q21	Glicogenoza tip Ia (von Gierke)	232200
Alfa-glicozidaza acidă	GAA	17q25.2	Glicogenoza tip II (Pompe)	232300
Amilo-1,6-glucozidaza	AGL	1p21	Glicogenoza tip IIIa (Cori)	232400
Enzima de ramificare a glicogenului	GBE1	3p12	Glicogenoza tip IV (Anderson)	232500
Fosforilaza musculară	PYGM	11q13	Glicogenoza tip V (McArdle)	232600
Boli ale metabolismului aminoacizilor				
Fenilalanin hidroxilaza	PAH	12q24.1	Fenilcetonuria	261600

Enzima	*Gena*	Localizare cromosomică	*Boala*	*OMIM*
Fumarilacetoacetat hidrolaza	FAH	15q23-q25	Tirozinemia tip 1	276700
Cistation beta-sintetaza	CBS	21q22.3	Homocistinuria	236200
Tirozinaza	TYR	11q14-q21	Albinismul oculocutanat	203100
Argininosuccinat sintetaza	ASS	9q34	Citrulinemia clasică	215700
Boli ale metabolismului lipidic				
Acil CoA dehidrogenaza lanţuri medii	ACADM	1p31	MCAD	607008
Acil CoA dehidrogenaza lanţuri lungi	ACADL	2q34-q35	LCAD	201460
Acil CoA dehidrogenaza lanţuri scurte	ACADS	12q22qter	SCAD	201470
Boli ale metabolismului purinic şi pirimidinic				
Hipoxantin guanin fosforiboziltransferaza	HPRT1	Xq26-q27.2	Sindromul Lesch-Nyhan	300322
Adenozin deaminaza	ADA	20q13.11	Imunodeficienţa combinată severă	102700
Boli ale metabolismului acizilor organici				
Homogentizic acid oxidaza	HGD	3q21-q23	Alcaptonuria	203500
Metilmalonil-CoA mutaza	MUT	6p21	Acidemia metilmalonică	251000
Propionil-CoA carboxilaza	PCCA	13q32	Acidemia propionică	606054
Boli ale metabolismului porfirinelor şi hemului				
Porfobilinogen deaminaza	PBGD	11q23.3	Porfiria acută intermitentă	176000
Uroporfirinogen decarboxilaza	UROD	1p34	Porfiria cutanea tarda	176100
Protoporfirinogen oxidaza	PPOX	1q22	Porfiria variegata	176200
UDP-glucuronozil transferaza	UGT1A1	2q37	Sindromul Gilbert	143500
Boli ale enzimelor lizozomale				
Alfa-L-iduronidaza	IDUA	4p16.3	Boala Hurler-Scheie	252800
Beta-hexozaminidaza izoenzima A	HEXA	15q23-q24	Boala Tay-Sachs	272800
Beta-glucozidaza acidă	GBA	1q21	Boala Gaucher tip 1	230800
Sfingomielinaza acidă	ASM	11p15.4	Boala Niemann-Pick	257200
Alfa-galactozidaza A	GLA	Xq22	Boala Fabry	301500
Boli ale enzimelor peroxizomale				
Catalaza	CAT	11p13	Acatalazemia	115500
Fitanoil CoA hidroxilaza	PAHX	10p11.2	Boala Refsum	266500
Tulburari în productia de energie				
Piruvat carboxilaza	PC	11q13.4	Sindromul Leigh	266150
Piruvat decarboxilaza	PDH	Xp22.1	Ataxia cu acidoză lactică tip I	208800
Boli ale enzimelor implicate în sinteza hormonilor				
21-hidroxilaza	CYP21A2	6p21.3	Hiperplazia adrenaliană congenitală	201910
Defecte ale enzimelor extracelulare				
Alfa-1 antitripsina	PI	14q32.1	Deficitul de alfa-1 antitripsina	107400

1.1 GALACTOZEMIA

Definiţie. Galactozemia (OMIM 230400) este o boală autosomal recesivă determinată de mutaţii ale genei care codifică galactozo-1-fosfat uridil transferaza (GAL-1-P uridil transferaza).

Incidenţă. Forma clasică de galactozemie este cea mai frecventă boală monogenică care interesează metabolismul carbohidraţilor, afectând 1/48.000 nou-născuţi.

Manifestările clinice apar la sugar, odată cu alimentaţia lactată, şi constau în incapacitatea de hrănire, hepatomegalie cu insuficienţă hepatică, tulburări neurologice, cataractă şi întârzierea dezvoltării neuromotorii. Pe termen îndelungat afecţiunea determină retard în creştere, retard mintal, ciroză hepatică macronodulară şi insuficienţă ovariană la femei.

Genetică. Galactozemia se transmite autosomal recesiv. Gena GALT este alcătuită din 11 exoni, dar peste 70% din mutaţiile cauzatoare ale acestei boli la caucazieni sunt reprezentate de o singură mutaţie punctiformă la nivelul exonului 6, care determină substituţia unei glutamine cu

arginina (Q188R). Indivizii homozigoţi pentru această mutaţie au o activitate enzimatică de circa 10%, ceea ce afectează capacitatea de conversie a galactozei în glucoză. Galactozemia poate fi determinată, de asemenea, de mutaţii ale genelor care codifică galactokinaza şi uridin difosfat galactozo-4-epimeraza (UDP-galactozo-4-epimeraza). Deficienţa galactokinazei asociază dezvoltarea cataractei, dar nu determină retardul creşterii, retard mintal sau afectare hepatică. Deficienţa UDP-galactozo-4-epimerazei poate fi limitată numai la nivelul eritrocitelor şi leucocitelor şi în acest caz nu determină manifestări clinice, sau poate fi sistemică şi determină manifestări clinice similare galactozemiei clasice.

Patogenie. Deficitul enzimatic de galactozo-1-fosfat uridil transferaza duce la acumularea galactozo-1-fosfatului şi galactiolului (figura 11.3).; primul metabolit este toxic pentru ficat, creier şi rinichi iar cel de al doilea se depune în cristalin

Diagnosticul se bazează pe datele clinice şi examenele de laborator care relevă galactozurie, valori crescute ale galactozei serice şi mai ales activitatea redusă a galactozo-1-fosfat uridil transferazei plasmatice. In prezent este larg utilizat *screening-ul neonatal* pentru această afecţiune, realizat prin măsurarea activităţii plasmatice a galactozo-1-fosfat uridil transferazei într-o picătură uscată de sânge. Identificarea precoce permite instituirea precoce a tratamentului dietetic care constă în mare în eliminarea aportului de galactoză. Este posibil şi *diagnosticul prenatal.*

Tratamentul dietetic prin reducerea aportului alimentar de galactoză permite prevenirea substanţială a morbidităţii asociate efectelor acute induse de metaboliţii galactozei. Cu toate acestea, tratamentul dietetic nu influenţează instalarea disfuncţiei cerebrale şi a insuficienţei ovariene.

Prognosticul este rezervat şi variabil la diferiţi pacienţi.

1.2. FENILCETONURIA

Definiţie. Fenilcetonuria (OMIM 261600) este o boală autosomal recesivă a metabolismului fenilalaninei determinată de mutaţii ale genei PAH (localizată pe cromosomul 12q24.1) care codifică fenilalanin hidroxilaza, enzima ce transformă fenilalanina în tirozină.

Incidenţa fenilcetonuriei este de circa 1/15.000 nou-născuti în populaţia caucaziană.

Manifestările clinice se instalează, de obicei, după primul trimestru de viaţă; nou-născutul este indemn din punct de vedere clinic, cu excepţia pigmentaţiei cutanate reduse asociată cu păr blond şi ochi albaştri (toate aceste semne fiind determinate de deficitul de tirozină, un precursor al melaninei). Boala se manifestă prin tulburări neurologice, retard somatic şi retard mintal; la aceste fenomene se mai pot adăuga mirosul particular al urinii (“de şoarece“ sau „de hambar“) şi o dermatită cronică descuamativă.

Genetică. Gena pentru PAH a fost izolată în 1986, iar studiile ulterioare au evidenţiat mare heterogenitate alelică la indivizii bolnavi. Astfel, au fost descrise peste 400 de mutaţii, dar majoritatea lor sunt foarte rare. Şase dintre aceste mutaţii sunt însă responsabile pentru circa două treimi din cazurile de fenilcetonurie în populaţia europeană. Datorită multitudinii acestor mutaţii, cei mai mulţi dintre bolnavi sunt heterozigoţi compuşi şi aceasta determină o diversitate largă a nivelelor reziduale ale activităţii enzimatice.

Patogenie. Deficitul PAH determină incapacitatea de transformare a fenilalaninei în tirozină şi acumularea în organism a fenilalaninei şi ai unor metaboliţi ai acesteia (acidul fenilpiruvic, fenillactic etc (figura 11.4) care determină leziuni ale sistemului nervos central în primii ani de copilărie. Excluderea fenilalaninei din alimentaţie previne apariţia acestor manifestări. Aproximativ o treime din pacienţii cu hiperfenilalaninemie nu prezintă mutaţii la nivelul PAH, ci ale unor enzime implicate în metabolismul tetrahidrobiopterinei (BH4), un cofactor al PAH. Aceste enzime sunt: pterin-4-alfa-carbinolamin dehidraza (PCD),

dihidropteridin reductaza (DHPR), guanozin trifosfat ciclohidraza (GTP-CH) şi 6-piruvoiltetrahidropterin sintetaza (6-PTS) – vezi figura 11.4. In cazul acestor pacienţi, restricţia aportului alimentar de fenilalanina nu este eficientă în evitarea problemelor neurologice, deoarece BH4 este cofactor pentru alte două enzime: tirozin-hidroxilaza şi triptofan-hidroxilaza care intervin în sinteza unor neurotransmitători monoaminci precum DOPA, norepinefrina, epinefrina şi serotonina. Ca urmare, la aceşti pacienţi este necesară suplimentarea cu L-DOPA şi 5-hidroxitriptofan.

Diagnosticul de certitudine se stabileşte pe baza următoarelor criterii: fenilalanina plasmatică mai mare de 20 mg/dl; eliminare urinară crescută de acid fenil-piruvic şi orto-hidroxi-fenil acetic; tirozina plasmatică normală; valoare normală a tetrahidrobiopterinei. Este important ca diagnosticul să se precizeze la nou-născut, înaintea apariţiei semnelor clinice, deoarece dieta restrictivă în fenilalanina previne instalarea acestora şi asigură o dezvoltare somatică şi neuro-psihică normală. În acest scop, în majoritatea ţărilor se efectuează screening-ul bolii, în maternităţi, după primele 3 zile de viaţă (interval în care copilul a primit fenilalanina, prin alimentaţia lactată), folosind testul Güthrie (bazat pe inhibiţia creşterii coloniilor de bacil subtilis de către fenilalanina din sânge); testul pozitiv impune evaluarea completă a pacientului, pentru precizarea diagnosticului. *Diagnosticul diferenţial* trebuie să excludă alte cauze de hiperfenilalaninemie la nou-născut sau – în cazul nedorit al unui diagnostic stabilit tardiv – alte cauze de encefalopatie cu spasticitate sau sindrom convulsiv şi retard mental.

Tratamentul este dietetic, având ca obiectiv reducerea aportului de fenilalanina la minimum necesar pentru asigurarea dezvoltării organismului, în aşa fel, încât fenilalanina plasmatică să se menţină la valori între 2-10 mg/dl (preferabil < 6 mg/dl). *Momentul* iniţierii este cât mai precoce, în prima lună de viaţă, cel mai târziu în primul trimestru, iar *durata* este indefinită.

Prognosticul. Dacă diagnosticul se face la naştere şi tratamentul dietetic este bine condus prognosticul este bun, indivizii afectaţi având o viaţă cvasi-normală. Femeile cu fenilcetonurie pot da însă naştere unor copii cu retard mental şi microcefalie (encefalopatia fenilpiruvică) dacă prezintă valori înalte ale fenilalaninei plasmatice. De aceea se recomandă ca înainte şi în cursul sarcinii, dieta să fie strict supravegheată, în aşa fel încât fenilalanina plasmatică să fie < 10 mg/dl (preferabil < 6 mg/dl).

1.3. BOLILE LIZOZOMALE

Bolile lizozomale sunt cauzate de deficitul unor enzime (hidrolaze) sau a altor proteine lizozomale funcţionale, care determină acumularea substratului nemetabolizat în lizozomi, la nivelul sistemului nervos central, viscerelor sau miocardului.

Au fost descrise până în prezent peste 40 de boli lizozomale, care realizează împreună o frecvenţă de 1/5.000 – 1/10.000 nou-născuţi. În funcţie de substratul metabolic acumulat, ele se grupează în mai multe categorii, cele mai importante sunt sfingolipidozele, mucopolizaharidozele şi mucolipidoze.

a. Sfingolipidozele constau în acumularea sfingolipidelor neutre şi gangliozidelor sau a unor produşi de metabolism ai acestora, predominant la nivelul substanţei albe (leucodistrofiile) sau a substanţei cenuşii (gangliozidozele) din SNC, mai rar în alte ţesuturi. De aceea majoritatea sfingolipidozelor determină suferinţă neurologică, secundară acumulării substratului nemetabolizat. Principalele tipuri de sfingolipidoze sunt: *boala Gaucher* (prin defict de β-glucozidaza), boala Fabry (prin deficit de α-galactozidază), gangliozidoza GM_1 (prin deficit de β-galactozidază), gangliozidoza GM_2 (prin deficit de β-hexozaminidază A) sau *boalaTay-Sachs*, *boala Niemann-Pick* (prin deficit de sfingomielinază) şi *leucodistrofia metacromatică* (prin deficit de arilsulfataza A).

Boala Gaucher este cea mai frecventă boală lizozomală (1:50.000 nou-născuţi), fiind produsă de către deficitul de β-glucozidază, cauzat de o serie de mutaţii la nivelul genei GBA, localizată pe cromozomului 1q21. În funcţie de severitatea deficitului enzimatic, vârsta de debut, prezenţa sau absenţa suferinţei neurologice şi evoluţie se descriu trei tipuri de boală Gaucher: *tipul I* (forma cronică, adultă sau nonneuronopatică), *tipul II* (infantil, neuronopatic acut) şi *tipul III* (juvenil, neuronopatic subacut). Boala se manifestă prin: splenomegalie şi hepatomegalie impresionantă; osteopatia, tradusă pe plan clinic prin dureri (crizele osoase) şi fracturi mai ales la nivelul oaselor membrelor, corpilor vertebrelor toracice şi pelvisului; simptome secundare de pancitopenie (sindromul anemic şi sindromul hemoragipar); suferinţă neurologică (în tipul II şi III). Testele specifice sunt: activitatea redusă a β-glucozidazei în leucocite şi prezenţa mutaţiei genice (analiza ADN)[2]. Boala Gaucher tipul I beneficiază de tratament substitutiv enzimatic cronic, cu enzimă (imingluceraza) obţinută prin tehnologia ADN-ului recombinant.

b. Mucopolizaharidozele (MPZ) sunt boli cu evoluţie progresivă, cauzate de acumularea intralizozomală în exces a mucopolizaharidelor acide, consecutivă deficitului unor enzime lizozomale. Mucopolizaharidele acide (glicozaminoglicanii) se leagă de obicei de proteine, cu care formează proteoglicanii, constituienţi majori ale substanţei de bază a ţesutului conjunctiv. În funcţie de defectul enzimatic se deosebesc mai multe tipuri de MPZ, diferite prin defectul enzimatic; cele mai frecvente sunt tipul I (*sindromul Hurler*); tipul II (*sindromul Hunter*); tipul III (*sindromul Sanfilippo*), tipul IV (*sindromul Morquio*). Simptomele şi semenele întâlnite în MPZ pot fi cauzate de acumularea tisulară de glicozaminoglicani (trăsături infiltrate ale feţei, tegumente îngroşate, opacifierea corneei şi hepato-spleno-cardiomegalie), deficitul funcţiilor celulare (retardul mintal, deficitul de creştere, displazia osoasă) sau de interferenţa dintre glicozaminoglicanii acumulaţi şi colagen sau fibronectină (osteoartropatia cu anchiloza în flexie, herniile).

c. Mucolipidozele se prezintă sub 4 tipuri: *sialidoza* (prin deficit de glicoprotein-sialidază), *mucolipidoza tip II* (boala ci celule I, secundară deficitului de N-acetil-glucozamino-fosfotransferază), *mucolipidoza III* (o formă mai puţin severă a aceluiaşi deficit enzimatic) şi *galactosialidoza*.

1.4. BOLILE PERXIZOMALE

Peroxizomii sunt organite subcelulare delimitate de o membrană lipidică trilaminară, prezenţi în toate celulele dar abundenţi în ficat şi rinichi. Matricea lor conţine peste 40 de enzime implicate în reacţiile de oxidare a acizilor graşi şi biosinteza colesterolului. Există două categorii principale de boli peroxizomale, produse fie de tulburări în biogeneza peroxizomilor (de exemplu, sindromul Zellweger, în care există o reducere marcată a numărului de peroxizomi), fie prin deficienţa unei anumite enzime peroxizomale (de exemplu, adrenoleucodistrofia, acatalazemia, boala Refsum).

Sindromul Zellweger este o boală letală, transmisă autosomal recesiv care în forma clasică se manifestă prin: dismorfie cranio-facială (fontanele cu suturi larg deschise, occiput plat, hipertelorism, epicantus, anomalii ale pavilioanelor auriculare); disfuncţie neurologică gravă (hipotonie, surditate de percepţie şi cataractă sau corioretinopatie, convulsii); retard psiho-motor, hepatosplenomegalie; icter colestatic (inconstant); chisturi renale şi retard somatic. Evoluţia este severă, cu deces în primul an de viaţă.

Adrenoleucodistrofia este cauzată de mutaţia unei gene localizate pe cromozomul X

[2] Primul Centru de Diagnostic al Bolilor Lizozomale din ţară, înfiinţat în anul 1997 la Cluj, a introdus recent diagnosticul enzimatic şi diagnosticul molecular pentru boala Gaucher .

(Xq 28), care determină sinteza unei proteine peroxizomale – ALDP – implicată în metabolismul acizilor graşi saturaţi cu lanţ foarte lung. Boala se transmite recesiv legat de X şi debutează deobicei după vârsta de 10 ani, prin scăderea performanţelor şcolare, tulburări de comportament, convulsii şi insuficienţă corticosuprarenală; se produce apoi pierderea progresivă a vederii, a vorbirii şi demenţă. Suferinţa neurologică severă, caracteristică bolii, este expresia unui proces progresiv de demielinizare cerebrală, determinat de efectul citotoxic al acizilor graşi saturaţi, cu lanţ foarte lung. Diagnosticul este confirmat prin demonstrarea valorilor crescute ale acizilor graşi cu lanţ foarte lung în plasmă sau fibroblaşti.

2. BOLI PRODUSE PRIN ANOMALII ALE PROTEINELOR DE TRANSPORT.

Deplasarea eficientă a moleculelor – spre interiorul celulelor, între diversele lor compartimente, precum şi între celule – necesită adeseori intervenţia unor macromolecule care *mediază* transportul lor. Circa o treime din totalul proteinelor care intră în structura diverselor membrane (ale celulelor sau ale diverselor organite) sunt implicate în procese de transport. La aceste procese participă însă şi unele proteine citoplasmatice sau proteine din spaţiul extracelular.

1. **Proteinele de transport transmembranare** pot fi clasificate în patru clase, primele două fiind implicate în difuziunea facilitată, iar ultimele două în transportul activ:
   - **Proteinele de transport *tip canal*** realizează pori care permit unor molecule mici, ce corespund ca dimensiune şi încărcare electrică, să traverseze membrana respectivă. Astfel, *aquaporinele* permit moleculelor de apă să străbată membrana mult mai rapid decât acestea o pot realiza prin stratul fosfolipidic iar *canalele ionice* mediază pasajul ionilor prin membrane. **Canalele ionice** sunt caracterizate prin trei proprietăţi: a) transportul realizat este extrem de rapid; b) sunt adeseori înalt selective pentru o anumită specie de ioni (fiind astfel clasificate în canale de sodiu, potasiu, clor, calciu sau canale cationice); c) majoritatea canalelor nu sunt permanent deschise, deschiderea lor fiind reglată fie prin legarea tranzitorie a unor liganzi (precum neurotransmitatori sau alte molecule de semnalizare – canale ligand dependente), fie ca răspuns la schimbarea potenţialului electric de-a lungul membranei (canale voltaj dependente). Majoritatea canalelor ionice sunt alcătuite din oligomeri ai unor subunităţi alfa identice sau omologe care formează porii, alături de subunitățti beta şi uneori gamma care sunt implicate în reglarea funcţiei lor. In genomul uman există circa 260 de gene care codifică diverse subunităţi ale canalelor ionice.
   - P**roteinele de transport *tip cărăuş*** leagă specific anumite moleculele la nivelul unei feţe a membranei şi apoi suferă o modificare conformaţională care permite moleculei să străbată membrana şi să fie eliberată pe faţa opusă. Asemenea proteine sunt implicate în transportul glucidelor, aminoacizilor, nucleozidelor etc. Există trei forme de transport mediat de proteinele cărăuş: *uniport* (transportul unei singure molecule prin difuziune facilitată), *cotransport* (transportul a două sau mai multe specii de molecule în aceeaşi direcţie) sau *antiport* (transportul a două sau mai multe specii de molecule în direcţii opuse). Ele nu utilizează nici o altă sursă de energie în afara de energia chimio-osmotică. Cele mai importante pentru patologia umană sunt proteinele din **familia SLC** (*solute carrier*). În genomul uman există 259 gene care codifică proteine ce aparţin acestei familii.
   - P**ompele ionice** (precum pompa $Na^+ - K^+$) utilizează energia obţinută prin hidroliza ATP pentru deplasarea ionilor *împotriva* unor gradiente de concentraţie. Ele fac parte din familia transportorilor ATP-azici, codificaţi în genomul uman de 251 de gene.
   - F**amilia transportorilor ABC** (ATP-binding cassette) este astfel denumită datorită prezenţei unor domenii de legare a ATP, înalt conservate. Au fost identificate circa 50 de gene umane care codifică asemenea proteine.
2. **Proteinele de transport intracitoplasmatice** sunt implicate în procese precum transportul oxigenului (hemoglobina), transportul asociat microtubulilor (dineina, dinactina, şi kinezina) sau procesele de trafic ale structurilor membranare (clatrinele, miozinele, proteinele RAB şi proteinele SNARE).
3. **Proteinele de transport plasmatice** asigură deplasarea a diverşi compuşi între compartimentele organismului. Asa sunt apolipoproteinele, transtiretina, ceruloplasmina etc.

Toate aceste categorii de proteine implicate în transportul unor molecule pot suferi modificări determinate de mutaţii, ce produc boli monogenice (vezi tabelul 11.2).

Mutaţiile implicate în producerea unor boli ale proteinelor de transport pot determina fie

pierdere de funcţie, fie câtig de funcţie.

- *Mutaţiile cu piederea funcţiei* determină *boli recesive*, aşa cum sunt fibroza chistică sau sindromul Bartter. In cazul proteinelor care formează complexe multimerice, acest tip de mutaţii pot avea însă *efecte dominant negative*. Este interesant de observat că în funcţie de prezenţa sau absenţa efectelor dominant negative, mutaţii diferite la nivelul aceleiaşi gene pot determina fie boli recesive, fie boli dominante. Aşa este de exemplu cazul mutaţiilor genei CLCN1 (care codifică canalul de clor de la nivelul muşchilor scheletici): unele mutaţii determină forma recesivă (tip Becker) de miotonie congenitală, alte mutaţii produc forma dominantă (tip Thomsen). In plus, formele recesive de boală pot prezenta simptome calitativ noi faţă de formele dominante; de exemplu, pacienţii heterozigoţi pentru mutaţii dominant negative ale genei KCNQ1 (canalul de potasiu voltaj dependent tip 1) prezintă sindrom QT-lung cu aritmii cardiace severe (sindromul Romano-Ward), în timp ce mutaţiile recesive, care determină pierderea completă a funcţiei, vor conduce la homozigoţi la asocierea aritmiilor cu surditatea congenitală (sindromul Jervell-Lange-Nielsen).
- *Mutaţiile cu câştig de funcţie* care vor produce de obicei boli transmise dominant. Un exemplu îl constituie mutaţiile subunităţilor beta sau gamma ale canalului renal epitelial de sodiu (SCNN1B sau SCNN1G) implicate în producerea sindromului Liddle (pseudoaldosteronism).

Având în vedere numărul foarte mare de boli genetice care pot fi produse prin anomalii ale proteinelor de transport trecere lor în revistă depăşeste scopul acestui capitol; de aceea am realizat în tabelul 11.2 o sinteză a principalelor categorii şi tipuri mai frecvente de boli şi ne vom limita în cele ce urmează doar la prezentarea unui exemplu ilustrativ – fibroza chistică.

Tabelul 11.2. Exemple de boli genetice produse prin mutaţii ale unor proteine de transport

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Boli prin mutaţii ale unor proteine canal				
Aquaporina 2	AQP2	12q13	Diabetul insipid nefrogen	107777
Subunitatea alfa a canalului de sodiu neuronal tip 1	SCN1A	2q24	Epilepsia generalizata cu crize comitiale febrile	182389
Subunitatea alfa a canalului de sodiu voltaj-dependent tip 4	SCN4A	17q23.1-q25.3	Paramiotonia congenitala	603967
Subunitatea alfa a canalului de sodiu voltaj-dependent tip 5	SCN5A	3p21	Sindromul Brugada	600163
Subunitatea alfa a canalului de sodiu nonvoltaj-dependent tip 1	SCNN1A	12p13	Pseudohipoaldosteronismul tip 1	600228
Subunitatile beta/gamma ale canalului de sodiu nonvoltaj tip 1	SCNN1B SCNN1G	6p13-p12 6p13-p12	Sindromul Liddle	600760 600761
Canalul de potasiu voltaj-dependent, subfamilia KQT, membrul 1	KCNQ1	11p15.5	Sindromul Romano-Ward (AD) Sindromul Jervell-Lange-Nielsen (AR)	192500
Canal de potasiu, subfamilia J, membrul 1	KCNJ1	11q24	Sindromul Bartter	600359
Canalde potasiu voltaj-dependent, subfamilia ISK, membrul 3	KCNE3	11q13-q14	Paralizia periodică	604433
Canal de calciu voltaj-dependent tip L, subunitatea alfa-1S	CACNA1S	1q32	Paralizia periodică hipokaliemică	114208
Canalul de clor tip 1 din muschii scheletici	CLCN1	7q35	Miotonia Becker (AR) sau Thomsen (AD)	118425
Canalul de clor tip 7	CLCN7	16p13	Osteopetroza	602727
Boli prin mutaţii ale proteinelor din familia SLC				
Transportorul de glucoza tip 2	SLC2A2	3q26.1-q26.3	Sindromul Fanconi-Bieckel	227810

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Transportorul pentru cistina, aminoacizi dibazici şi neutri	SLC3A1	2p16.3	Cistinuria	220100
Schimbatorul de anioni tip 1/proteina banda 3	SLC4A1	17q21-q22	Sferocitoza ereditară	182900
Cotransportorul sodiu-glucoza	SLC5A1	22q13.1	Malabsorbţia pentru glucoză/galactoză	606824
Cotransportor sodiu-iod	SLC5A5	19p13.2-p12	Hipotiroidia congenitala	274400
Transportorul ileal pentru sodiu şi acizi biliari	SLC10A2	13q33	Malabsorbţia primară a acizilor biliari	601295
Cotransportorul sodiu-clor	SLC12A3	16q13	Sindromul Gitelman	263800
Transportorul de urati	SLC22A12	11q13	Hipouricemia renală	220150
Transportor ADP/ATP mitocondrial	SLC25A4	4q35	Oftalmoplegia externă progresivă cu deletii ale ADN mitocondrial	157640
Transportor de citrina	SLC25A13	7q21.3	Citrulinemia tip II cu debut adult	603471
Transportor de zinc	SLC39A4	8q24.3	Acrodermatita enteropatică	201100
Boli prin mutaţii ale proteinelor din familia ATPaze-lor				
Transportor Na+-K+, subunitatea alfa 2	ATP1A2	1q21-q23	Migrena familială hemiplegică	602481
Transportor rapid de Ca2+	ATP2A1	16p12	Miopatia Brody	601003
Transportor lent de Ca2+	ATP2A2	12q23-q24.1	Boala Darier	124200
Transportor lizozomal de H+	ATP6V0A4	7q33-q34	Acidoza tubulară renală distală AR	602722
Transportor de Cu2+, Polipeptid beta	ATP7B	13q14.3-q21.1	Boala Wilson	277900
Transportor de Cu2+, Polipeptid alfa	ATP7A	Xq12-q13	Boala Menkes	309400
Boli prin mutaţii ale unor proteine din familia ABC				
Proteina ABC, subfamilia A, membrul 1	ABCA1	9q22-q31	Boala Tangier	205400
Proteina ABC, subfamilia A, membrul 4	ABCA4	1p21-p13	Boala Stargardt	248200
Proteina ABC, subfamilia B, membrul 11	ABCB11	2q34	Colestaza familială progresivă intrahepatică tip 2	601847
Proteina ABC, subfamilia C, membrul 2	ABCC2	10q24	Sindromul Dubin-Johnson	237500
Proteina ABC, subfamilia C, membrul 6	ABCC6	16p13.1	Pseudoxantoma elasticum AR sau AD	264800 177650
Proteina ABC, subfamilia C, membrul7	ABCC7	7q31.2	Fibroza chistică	219700
Proteina ABC, subfamilia D, membrul 1	ABCD1	Xq28	Adrenoleucodistrofia	300100
Proteina ABC, subfamilia G, membrul 5	ABCG5	2p21	Sitosterolemia	210250
Proteina ABC, subfamilia G, membrul 8	ABCG8	2p21	Sitosterolemia	210250
Boli produse prin mutaţii ale proteinelor de transport citoplasmatice				
Hemoglobina beta	HBB	11p15.5	Hemoglobinopatia Kempsey	141900
Dineina axonemala lantul intermediar tip 1	DNAI1	9p21-p13	Sindromul Kartagener	244400
Dinactina 1	DCTN1	2p13	Boala Lower	607641
Kinezina 5A	KIF5A	12q13	Paraplegia spastică tip 10	604187
Kinezina 1B	KIF1B	1p36.2	Boala Charcot-Marie-Tooth tip2A	118210
Proteina RAB27	RAB27A	15q21	Sindromul Griscelli	607624
Proteina RAB7	RAB7	3q21	Boala Charcot-Marie-Tooth 2B	600882
Proteina de escorta tip 1 a RAB	REP1	Xq21.2	Coroideremia	303100

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Miozina tip VIIa	MYO7A	11q13.5	Sindromul Usher	276900
Boli produse prin mutaţii ale proteinelor de transport plasmatice				
Apolipoproteina E	APOE	19q13.2	Hiperlipoproteinemia tip III	107741
Apolipoproteina B	APOB	2p24	Hipobetalipoproteinemia familiala	107730
Apolipoproteina C-II	APOC2	19q13.2	Hiperlipoproteinemia tip IB	207750
Transtiretina (prealbumina ce leaga tiroxina)	TTR	18q11.2-q12.1	Amiloidoza familială tip 1	176300
Ceruloplasmina	CP	3q23-q24	Aceruloplasminemia	604290

2.1.FIBROZA CHISTICĂ

Fibroza chistică sau mucoviscidoza (OMIM 219700) este una dintre cele mai frecvente boli genetice cu transmitere autosomal recesivă din populaţia caucaziană, prevalenţa sa fiind estimată la aproximativ 1/2000, iar incidenţa purtătorilor sănătoşi (Na) – la 1/25.

Simptomatologie. Principalele manifestări clinice ale bolii sunt determinate de afectarea plămânilor şi pancreasului exocrin. Afectarea acestor organe este rezultatul secreţiilor vâscoase ale glandelor exocrine, care determină obstrucţia structurilor canaliculare. La nivel pulmonar aceasta determină infecţii recurente cu evoluţie spre insuficienţa pulmonară, iar obstrucţia canalelor pancreatice are drept consecinţă deficienţa enzimelor pancreatice, cu afectarea digestiei. Un semn major pentru diagnostic este creşterea concentraţiei de sodiu şi clor în secreţiile sudorale (peste 60mEq/L). Alte manifestări clinice constau în ileusul meconial, la 10-25% din nou-născuţii cu fibroza chistică, şi absenţa congenitală bilaterală a vaselor deferente la băieţi în 95% din cazuri.

Genetică. Gena responsabilă de producerea bolii a fost identificată prin clonare în 1989 şi denumită CF (de la *cystic fibrosis*). Analizele funcţionale au demonstrat că proteina codificată de gena CF (denumită CFTR) acţionează ca un canal de clor localizat la nivelul polului apical al celulelor epiteliale afectate în cadrul acestei boli. Recent, gena CF a fost inclusă în familia genelor transportorilor ABC (cu casetă de legare a ATP), fiind desemnată ca ABCC7. Frecvenţa crescută a heterozigoţilor în populaţia generală a condus la emiterea ipotezei că starea de heterozigot prezintă un avantaj selectiv; această ipoteză este susţinută de descoperirea faptului că produsul proteic al genei ABCC7 funcţionează ca receptor pentru *Salmonella typhimurium* şi este implicat în imunitatea împotriva infecţiilor cu *Pseudomonas aeruginosa,* deci heterozigoţii sunt mai rezistenţi la aceste infecţii.

Gena ABCC7 este localizată pe cromosomul 7q31 şi conţine 27 de exoni care codifică o proteină canal de clor transmembranară alcătuită din cinci domenii funcţionale: două domenii transmembranare (MSD – *membrane spanning domains*), două domenii de legare a ATP (NBD – *nucleotide binding domains*) şi un domeniu reglator (R) cu mai multe situsuri de fosforilare (figura 11.5). Prima mutaţie identificată a fost o deleţie a trei nucleotide soldată cu absenţa aminoacidului fenilalanina din poziţia 508 a proteinei (ΔF508). Această mutaţie este cea mai frecventă în populaţia caucaziană, reprezentând circa 70% din toate mutaţiile. Au fost descrise însă numeroase alte mutaţii, deşi doar 7 dintre ele au frecvente care depasesc 0,5%; Frcevenţa lor în diferite populaţii este însă variată. Astfel, mutaţia W1282X este prezentă la 51% dintre bolnavii din comunitatea evreilor Ashkenazi, în timp ce mutaţia 1677delTA este întilnită cu o frecvenţă crescută în Balcani şi Asia Mica. In populaţiile în care frecvenţa alelei ΔF508 este de aproximativ 70%, mai mult de jumatate dintre pacienţi sunt homozigoţi pentru această mutaţie, în timp ce alţi 30% sunt heterozigoţi compuşi.

S-au descris patru clase de mutaţii ale genei ABCC7:

- mutaţiile de clasa I conduc la defecte în producţia proteinei; astfel de mutatii sunt cele care determina apariţia

unor codoni stop sau a unor specii instabile de ARNm;
- mutaţiile de clasa II (cum este, de exemplu, ΔF508) au ca rezultat producerea unor defecte ale procesării proteinei (defecte de plicaturare);
- mutaţiile de clasa III apar la nivelul domeniilor NBD sau R şi produc dereglari ale activităţii proteinei;
- mutaţiile de clasa IV sunt localizate la nivelul domeniilor MBD şi alterează capacitatea de transport a clorului.

Gradul crescut de heterogenitate clinică observat în cadrul bolii este determinat de heterogenitatea alelică, dar şi de intervenţia unor *gene modificatoare* sau a unor factori de mediu. S-a stabilit existenţa unei corelatii între tipul mutaţiilor şi funcţia pancreatică. Astfel, mutaţiile nonsens care produc alele nule sau homozigozitatea pentru mutaţia ΔF508 tind să se asocieze cu insuficienţa pancreatică, în timp ce mutaţiile care permit sinteza unei proteine parţial funcţionale – ca, de exemplu, R334W – nu alterează funcţia pancreatică. In schimb, la purtătorii aceleeaşi mutaţii există un grad crescut de variabilitate a alterării pulmonare. Până în prezent nu a fost identificată nici o genă modificatoare a fenotipului pulmonar, însă o genă modificatoare care influenţează apariţia ileusului meconial a fost localizată pe cromosomul 19q13. In sfârşit, la pacienţii homozigoti pentru alele care alterează doar într-o măsură redusă funcţia CFTR singurul semn al bolii il poate reprezenta doar absenţa congenitală bilaterală a vaselor deferente. Recent s-a constatat ca heterozigoţii pentru mutaţii CF pot avea o incidenţă crescută a pancreatitei şi bronsiectaziei.

Screening neonatal. Fibroza chistică întruneşte majoritatea criteriilor necesare pentru introducerea sa în programele de screening neonatal. Cu toate acestea, nu este clar dacă detectarea prin screening a pacienţilor îmbunătăteşte semnificativ supravieţuirea lor. Un obstacol il constituie heterogenitatea genetică a bolii, peste 5% dintre pacienţi fiind heterozigoţi compuşi pentru alele rare în populaţie. Tipic, screening-ul este realizat pentru 10 până la 30 dintre cele mai frecvente mutaţii din regiunea geografică respectivă.

Diagnostic prenatal este indicat în special în cazul familiilor în care există bolnavi cu fibroză chistică.

Tratament. In prezent, circa 50% din pacienţi depăşesc vârsta de 26 de ani. Un rol major în prelungirea vietii îl au tratamentul intensiv al bolii pulmonare şi suplimentarea enzimelor pancreatice.

3. BOLI PRIN ANOMALII ALE PROTEINELOR STRUCTURALE

Proteinele structurale asigură forma şi organizarea caracteristică a celulelor şi ţesuturilor citoplasmei. Se pot deosebi trei categorii majore de proteine structurale: proteine ale citoscheletului celular, proteine ale structurii membranare şi proteine structurale extracelulare.

- **Citoscheletul celular** este alcătuit din trei tipuri principale de proteine filamentoase: filamentele de actina, filamentele intermediare şi microtubulii, care sunt menţinute împreună şi ataşate la organitele celulare şi la membrana plasmatică printr-o varietate de proteine accesorii.

  Filamentele de actină sunt alcătuite în principal din monomeri de *actină G* (gamma) polimerizaţi sub forma unor filamente cu aspect dublu helicoidal. Aceste filamente se asociază cu o serie de proteine care au rol în organizarea în reţele a filamentelor de actină, precum *alfa-actinina, filamina, vilina* şi *fimbrina*. Filamentele de actină se ataşează şi la nivelul membranei celulare prin intermediul unor complexe proteice, diferite în funcţie de tipul celular. Astfel, la nivelul eritrocitelor, reţeaua filamentelor de actină este ataşată la nivelul *proteinelor banda 3* membranare prin intermediul unor complexe proteice care conţin *spectrina, ankirina, proteina banda 4.1* şi *aducina*. Alte proteine din familia spectrinei sunt *distrofina* (in celulele musculare striate) sau *fodrina*. In plachete, *filamina* este echivalentul proteinei 4.1 eritrocitare iar în celulele epiteliale *ezrina* ataşează filamentele de actina la CFTR. In sfârşit, filamentele de actină pot fi ataşate la o serie de structuri specializate ale membranei plasmatice numite joncţiuni. Astfel, *talina, vinculina* şi *alfa-catenina* mediază ancorarea filamentelor de actină la *integrinele* din structura joncţiunilor focale, în timp ce *beta-cateninele* mediază interacţiunea filamentelor de actina cu *caderinele* din structura joncţiunilor aderente.

  Filamentele intermediare sunt alcătuite dintr-o varietate de proteine care diferă în funcţie de tipul celular. Au fost identificate peste 50 asemenea proteine care au fost clasificate în 6 grupuri: tipul I (*keratinele acide* –

localizate în celulele epiteliale), tipul II (*keratinele neutre* şi *bazice* – în celulele epiteliale), tipul III (*vimentina* – în fibroblaşti, eritrocite, *desmina* – în celulele musculare, *proteina fibrilara acidă bazică glială* – în celulele gliale, *periferina* – în neuronii periferici), tipul IV (*proteinele neurofilamentare*: *NF-L, NF-M, NF-H* – în neuroni), tipul V (*laminele A, B* şi *C* în membranele nucleare) şi tipul VI (*nestina* – în celulele stem ale SNC). Filamentele intermediare sunt deseori organizate sub forma unor heterodimeri (de exemplu keratinele tip I şi II sunt întotdeauna heterodimeri, la fel ca şi neurofilamentele). Filamentele de keratină şi vimentina sunt ataşate la membrana nucleară, având se pare rol în poziţionarea acestuia în celulă. In plus, filamentele intermediare sunt ataşate şi la nivelul a două structuri specializate ale membranei plasmatice: desmozomii şi hemidesmozomii.

Microtubulii sunt alcătuiţi din două tipuri principale de proteine, *tubulinele alfa* şi *beta*. Ei sunt implicaţi în realizarea structurilor caracteristice unor tipuri celulare, cum sunt axonii celulelor nervoase, axonema flagelului spermatozoizilor sau banda marginală a plachetelor, precum şi în funcţionarea aparatului mitotic etc.

- **Proteinele de structură membranare** sunt implicate în adeziunea şi comunicarea intercelulară. Există cinci clase principale de proteine de adeziune intercelulară (CAMs – *cell adhesion molecules*): caderinele (precum *caderinele E, P şi N*), *superfamilia imunogobulinelor* (*N-CAM* şi *I-CAM*), *selectinele* (precum *selectina P*), *mucinele* şi *integrinele* (reprezentate de *integrinele alfa şi beta*). Deşi sute de asemenea proteine individuale sunt suficiente pentru a asigura adeziunea intercelulară, există şi o serie de aglomerări ale unor asemenea proteine care realizează structuri specializate în adeziunea intercelulară. Acestea sunt reprezentate de *joncţiunile aderente* (ce conţin *caderine E* alături de *cateninele alfa* şi *beta*), *desmozomii* (alcătuite din *plakoglobina*, *desmogleina* – înrudită cu caderinele şi *desmocolina*), *joncţiunile strânse* (alcătuite din *claudine* şi *ocludine*) şi *joncţiunile gap* (alcătuite din *conexine*,cu în comunicarea intercelulara).
- **Proteinele matricei extracelulare** au drept reprezentant principal *colagenul*, cea mai abundentă proteină animală. Se cunosc peste 30 de tipuri de colagen care sunt caracterizate prin formarea unor triplu-helixuri. Alte componente proteice majore ale matricei extracelulare sunt *elastinele*, *fibrilinele* şi *fibronectina*, ultima fiind principala proteină de adeziune a componentelor ţesutului conjunctiv între ele precum şi la integrinele membranare. Printre specializările matricei extracelulare se numără lamina bazală alcătuita dintr-o reţea de *colagen tip IV, laminină, perlecan şi enactină*.

Mutaţiile genelor ce codifică proteinelor structurale determină boli genetice care pot afecta toate organele şi sistemele. Printre clasele cele mai frecvente pot fi amintite *colagenozele, keratinopatiile, fibrilinopatiile, distrofiile musculare* etc. Intrucât multe din proteinele de structură descrise anterior formează homo- sau heteropolimeri, mutaţiile lor vor avea adeseori *efecte dominant-negative,* ceea ce va conduce la o *transmitere dominantă* a bolilor. Aşa sunt majoritatea bolilor proteinelor matricei extracelulare sau ale filamentelor intermediare. Dată fiind asemănarea structurală şi funcţională a proteinelor din anumite familii (precum cea a colagenilor, keratinelor etc.), mutaţii la nivelul unor gene diferite pot produce boli genetice identice clinic.

De exemplu, în cazul keratinopatiilor, keratinopatia palmoplantară epidermolitică este determinată de mutaţii ale genelor KRT1 şi KRT9; distrofia corneala Meesmann este determinată de mutaţii ale genelor KRT3 şi KRT12, în timp ce pachionichia congenitală este determinată de mutaţii ale genelor KRT6A, KRT6B, KRT16 şi KRT17.

Pe de altă parte, acest fenomen al heterogenităţii genetice de locus este asociat cu fenomenul invers, în care mutaţiile unei singure gene pot determina boli genetice diferite.

Astfel, mutaţiile genei pentru lamina A produc: distrofia musculara Emery Dreifuss cu transmitere AD (OMIM 181350), distrofia musculară a centurilor tip 1B (OMIM 159001), cardiomiopatia dilatativă tip 1 (cu defect de conducere – OMIM 115200), boală Charcot-Marie-Tooth tip 2B1 (OMIM 605588), lipodistrofia familială parţială (OMIM 151660), sau progeria Hutchinson-Gilford (OMIM 176670).

În tabelul 11.3 am selectat exemplele cele mai reprezentative de boli monogenice produse prin anomali ale unor proteine structurale, pentru a avea o informaţie preliminară privind complexitatea acestei categorii de boli şi indicaţiile OMIM pentru obţinerea unor date suplimentare. În ceea ce urmează vom descrie câteva dintre cele mai frecvente boli din această categorie: distrofiile musculare Duchenne şi Becker, osteogenesis imperfecta, sferocitoza ereditară, sindromul Ehlers-Danlos; sindromul Marfan a fost descris în capitolul 4 (vezi caseta 4.1).

Tabelul 11.3 Exemple de boli genetice produse prin mutaţii ale unor proteine de structură.

Proteina	Gena	Localizarea cromosomică	Boala	OMIM
Boli prin mutaţii ale proteinelor citoscheletului celular				
Actina alfa cardiacă	ACTC	15q14.5	Cardiomiopatia idiopatică dilatativă	115200
Actina alfa scheletică	ACTA	1q42.1	Miopatia nemalinica tipul sever	256030
Filamina alfa	FLNA	Xq28	Heterotopia periventriculară	300049
Proteina 4.1 eritrocitară	EPB41	1p36.2-p34	Eliptocitoza ereditară	130500
Spectrina alfa eritrocitară	SPTA1	1q21	Eliptocitoza	182860
Spectrina beta eritrocitară	SPTB	14q22-q23.1	Eliptocitoza tip 3	182870
Ankirina tip 1	ANK1	8p11.2	Sferocitoza ereditară	182900
Ankirina tip 2	ANK2	4q25-q27	Sindromul QT lung tip 4	600919
Distrofina	DMD	Xp21.2	Distrofia musculara Duchenne	300377
Titina	TTN	2q24.3	Distrofia musculara tibială tardivă	600334
Keratina tip 1	KRT1	12q13	Hiperkeratoza epidermolitică	113800
Keratina tip 5	KRT5	12q13	Epidermoliza buloasa simplex	131900
Keratina tip 9	KRT9	17q12-q21	Keratodermia epidermolitică palmoplantară	144200
Keratina 12	KRT12	17q12	Distrofia corneală Meesmann	122100
Desmina	DES	2q35	Miopatia legată de desmină	601419
Proteina fibrilară acidă glială	GFAP	17q21	Boala Alexander	203450
Proteina neurofilamentară uşoară	NEFL	8p21	Boala Charcot-Marie-Tooth tip 2E	607684
Lamina A	LMNA	1q21.2	Progeria Hutchinson-Gilford	176670
Emerina (proteina asociată l aminelor)	EMD	Xq28	Distrofia musculara Emery-Dreifuss	310300
Proteina *tau* (asociată microtubulilor)	MAPT	17q21.2	Demenţa frontotemporală cu parkinsonism	600274
Boli produse prin mutaţii ale proteinelor de structură membranare				
Caderina E	CDH1	16q22.1	Cancerul gastric difuz familial	137215
Integrina beta 3	ITGB3	17q21.32	Trombastenia Glanzmann	173470
Integrina beta 4	ITGB4	17q11-qter	Epidermoliza buloasa letală cu atrezie pilorică	226730
Desmoplakina	DSP	6p24	Keratoza palmoplantară striată	125647
Placofilina	PKP1	1q32	Displazia ectodermală	604536
Claudina 14	CLDN14	21q22.3	Surditate AR	605608
Claudina 16	CLDN16	3q27	Hipomagneziemia primară	248250
Boli produse prin mutaţii ale proteinelor matricei extracelulare				
Colagenul tip I, alfa-1	COL1A1	17q21.31-q22	Osteogeneis imperfectă tipurile I-IV	166200 166220
Colagenul tip II, alfa-1	COL2A1	12q13.1- q13.2	Sindromul Stickler tip I	108300
Colagenul tip IV, alfa-3	COL4A3	2q36-q37	Sindromul Alport AR	203780
Colagenul tip V, alfa-2	COL5A2	2q31	Sindromul Ehlers-Danlos tip I-II	130000 130010
Colagenul tip VI, alfa-2	COL6A2	21q22.3	Distrofia musculară scleroatonică Ullrich	254090
Colagenul tip VII, alfa-1	COL7A1	3p21.3	Epidermoliza buloasă distrofică recesivă	226600
Colagenul tip IX, alfa-2	COL9A2	1p33-p32.2	Distrofia epifizeală multiplă tip 2	600204
Colagenul tip X, alfa-1	COL10A1	6q21-q22.3	Condrodisplazia metafizeala tip Schmid	156500
Elastina	ELN	7q11.2	Stenoza aortică supravalvulară	185500
Fibrilina 1	FBN1	15q21.1	Sindromul Marfan	154700
Fibrilina 2	FBN2	5q23-q31	Arahnodactilia contracturală congenitală	121050
Laminina alfa-2	LAMA2	6q22-q23	Distrofia musculară congenitală cu deficit de merozină	156225

Proteina	Gena	Localizarea cromosomică	Boala	OMIM
Laminina gamma-2	LAMC2	1q25-q31	Epidermoliza buloasă joncţională tip Herlitz	226700
Perlecanul	HSPG2	1p36.1	Displazia dissegmentală Silverman-Handmaker	224410

3.1. DISTROFIA MUSCULARĂ DUCHENNE

Distrofia musculară Duchenne (OMIM 300377) este o boală transmisă legat de X cu o incidenţă de circa 1 la 3300 nou-născuţi de sex masculin. Gena a cărei mutaţii determină distrofia musculară Duchenne a fost identificată în 1986 fiind una dintre primele descoperiri majore care au evidenţiat potenţialul pe care îl are medicina moleculară.

Simptomatologie. Pacienţii se dezvoltă normal până la vârsta de 3 – 5 ani, când încep să apară semne de hipotrofie (distrofie) musculară manifestată predominant prin hipotonie musculară. Aceasta debutează la nivelul musculaturii membrelor inferioare şi evoluează ascendent, până ce afectează musculatura respiratorie şi determină decesul pacienţilor prin insuficienţa respiratorie în jurul vârstei de 20 de ani. La aceste fenomene se asociază şi retardul mintal moderat, cu o reducere medie a QI de 20 puncte. Forma Becker de distrofie musculară este determinată, de asemenea, de mutaţii ale genei pentru distrofină (circa 15% din mutaţiile acestui locus), dar manifestările clinice sunt mai puţin severe, iar supravieţuirea este mai îndelungată. Majoritatea femeilor purtătoare nu prezintă manifestări clinice, deşi 70% din ele au nivele crescute ale creatinkinazei serice. Inactivarea preferenţială a cromosomului X purtător al mutaţiei pare a contribui la absenţa manifestărilor clinice la femeile purtătoare. Există însă şi cazuri (circa 8% din femeile heterozigote) când inactivarea cromosomului X interesează preferenţial cromosomul X cu gena DMD normală, ceea ce determină hipotonie musculară semnificativă. Există chiar şi cazuri rare de manifestări clinice complete la sexul feminin(in unele translocaţii X; autosomale sau în sindromul Turner).

Genetică. Gena DMD este cea mai mare genă umană, cu o lungime de peste 2 Mb, adică 1,5% din lungimea cromosomului X. Această lungime explică cel puţin în parte rata crescută a mutaţiilor/locus (10^{-4}) comparativ cu alte gene. Gena este alcătuită din 79 de exoni, cu 7 promotori care sunt responsabili de producerea de izoforme cu specificitate tisulară. Izoforma majoră este o proteină voluminoasă (427 kD) care predomină în muşchii scheletici, in miocard şi în creier şi îndeplineşte două funcţii majore: rol structural în menţinerea integrităţii membranei (prin medierea interacţiunii între citoscheletul actinic şi matricea extracelulară – vezi figura 11.6) şi rol în funcţionarea joncţiunilor sinaptice.

Cele mai frecvente mutaţii la pacienţii cu distrofie musculară Duchenne sunt deleţiile (60%) care în marea lor majoritate sunt localizate în regiunea 5' sau în zona centrală a genei. Mutaţiile punctiforme reprezintă circa o treime din cazuri şi sunt răspândite pe întreaga lungime a genei. Circa o treime din cazurile de DMD sunt determinate de mutaţii de novo, în timp ce restul provin de la mame purtătoare ale mutaţiei. Deoarece boala este letală, bărbaţii afectati nu transmit mutaţia. In cazul formei Becker de boală, capacitatea reproductivă este de circa 70%, iar bărbatii bolnavi pot transmite mutaţia la fetele lor. Ca urmare, o proporţie însemnată din cazuri sunt moştenite în familie şi doar 10% sunt determinate de mutaţii de novo.

Diagnostic prenatal al DMD este posibil. In 60-70% din cazuri (determinate de deleţii) defectul poate fi pus în evidenţa prin Southern blot sau prin PCR multiplex (figura 11.7). In familiile în care mutaţia nu este cunoscută se pot utiliza analizele de înlănţuire. De asemeni, identificarea femeilor purtătoare printre rudele unor băieţi afectaţi se poate realiza cu succes în 75% din cazuri, prin dozarea nivelului creatinkinazei serice.

Tratament. Singurul tratament utilizat este cel simptomatic. Există însă numeroase studii care încearcă să abordeze diverse alte metode de tratament (precum terapia genică) care vor fi discutate în capitolul 19.

3.2 OSTEOGENEZA IMPERFECTĂ

Osteogeneza imperfectă (OMIM 166200 – 166260) reuneşte un grup de boli transmise autosomal dominant, produse prin mutaţii ale colagenului tip I, ce determină predispoziţie la deformaţii scheletice şi fracturi osoase în urma unor traumatisme minime. Incidenţa lor cumulată este de circa 1 la 10000 în populaţia generală.

Simptomatologie. Din punct de vedere clinic se deosebesc patru tipuri majore de boală. Tipul I de boală (forma uşoară) se caracterizează prin asocierea fragilităţii osoase cu sclere albastre şi eventual surditate presenilă; deformaţiile scheletice sunt absente. Tipul II (sever) este letal în perioada neonatală şi asociază fracturi osoase, deformaţii scheletice şi sclere de culoare închisă. Tipul III asociază adeseori fracturi prezente la naştere cu deformaţii osoase progresive, hipostatură, sclere albastre, tulburări ale dentiţiei şi surditate. In tipul IV, sclerele au aspect normal, deformaţiile osoase sunt uşoare sau moderate dar persistă susceptibilitatea la fracturi, surditate şi anomalii ale dentiţiei.

Genetică. Heterogenitatea clinică este explicată cel puţin în parte prin heterogenitatea alelică şi de locus: fenotipul variază în funcţie de tipul de lanţ al procolagenului I care este afectat şi de localizarea mutaţiei la nivelul fiecărui locus. Au fost descrise peste 200 de mutaţii diferite ce afectează genele pentru colagenul I. Colagenul tip I este principala proteină structurală la nivelul osului şi altor ţesuturi fibroase. Moleculele de procolagen tip I sunt alcătuite din două lanţuri alfa1(I), codificate de o genă de pe cromosomul 17, şi un lanţ alfa2(I) codificat de o genă de pe cromosomul 7. Asamblarea acestor lanţuri într-un triplu helix în cursul maturării procolagenului începe la nivelul capătului C-terminal şi evoluează către capătul N-terminal. Ca urmare, mutaţiile în porţiunea C-terminală au efecte mai severe. De asemenea, mutaţiile la nivelul procolagenului alfa1(I) tind să aibă efecte mai severe decât mutaţiile la nivelul procolagenului alfa2(I), datorită efectelor dominant negative (vezi figura 11.1).

Se pot deosebi două tipuri majore de mutaţii implicate în etiologia osteogenezei imperfectă: mutaţii ce determină reducerea producţiei de colagen tip I şi mutaţii care determină sinteza unor molecule anormale structural. Reducerea cantităţii de colagen I sintetizată este consecinţa unor mutaţii care au un efect sever asupra proteinei codificate. Sunt implicate în special mutaţii cu apariţia unor codoni stop prematuri, mici deleţii sau inserţii ce determină decalarea cadrului de lectură sau mutaţii ale situsurilor de matisare. Aceste mutaţii interesează de regulă lanţurile alfa1(I) şi sunt implicate în producerea tipului I de boală. Mutaţiile care determină sinteza unor lanţuri proteice anormale, dar stabile tind să aibă consecinţe clinice mai severe şi se asociază cu formele II-IV de boală. Foarte multe dintre aceste mutaţii sunt substituţii ale unor aminoacizi. Substituţiile la nivelul repetiţiilor Gly-X-Y (unde X este adeseori prolina, iar Y este adesori hidroxiprolina) au efectele cele mai importante. Este important de asemenea tipul de substituţie. De exemplu, înlocuirea glicinei (aminoacid neutru) din repetiţia amintită cu aspartatul (reziduu acid) are efecte disruptive majore, fiind asociată frecvent cu forma severă (tip II) de boală. Asemenea forme de mutaţii letale nu pot să fie transmise în succesiunea generaţiilor şi vor fi întâlnite ca mutaţii de novo sau, mai rar, în cazul unor mozaicisme germinale. Există şi cazuri când aceeaşi mutaţie asociază fenotipuri diferite, ceea ce reflectă intervenţia unor gene modificatoare.

Diagnostic prenatal şi sfat genetic. Cunoştinţele acumulate în înţelegerea efectelor pe care diferite mutaţii le pot avea asupra structurii şi funcţiei colagenului permit în oarecare măsură predicţia istoricului natural al bolii atunci când este identificată o mutaţie în cadrul activităţilor de

diagnostic prenatal. In plus, asocierea care există între mutaţii şi tipul de transmitere (dominant sau recesiv), permite o apreciere mai corectă a riscului de recurenţă a bolii.

Tratamentul bolii consta în mare măsură, până nu de mult, numai în simpla corecţie chirurgicală a efectelor fracturilor osoase. In prezent se asociază cu succes biofosfonaţii, o clasă de compuşi care reduce resorbţia osoasă, crescând densitatea şi conţinutul mineral al acestora la pacienţii cu forme severe de boală.

3.3 SFEROCITOZA EREDITARĂ

Sferocitoza ereditară (OMIM 182900) este o boală genetică determinată de mutaţii ale unor gene care codifică proteine de structură ale membranei eritrocitare. Frecvenţa bolii este apreciată a fi de circa 1 la 5000 indivizi în populaţia europeană.

Simptomatologie. Boala se caracterizează printr-o marcată heterogenitate clinică, de la forme cvasiasimptomatice până la forme cu anemie hemolitică fulminantă. Trăsătura morfologică a bolii este prezenţa microsferocitelor, rezultatul unor pierderi ale membranei eritrocitare. Se adaugă o fragilitate osmotică anormală *in vitro*. Sferocitele sunt eliminate rapid din circulaţie la nivelul splinei (hemoliză extravasculară). Ca urmare, splenomegalia este una dintre trăsăturile dominante ale bolii. Principalele complicaţii sunt aplazia sau criza megaloblastică, criza hemolitică, colecistita şi colelitiaza şi hemoliza neonatală severă.

Genetică. Boala este transmisă de regulă autosomal dominant. In acest caz indivizii bolnavi sunt heterozigoţi pentru mutaţia cauzatoare a bolii, formele homozigote nefiind descrise (probabil sunt incompatibile cu viaţa). Circa 25% din cazuri, deşi determinate de mutaţii dominante, nu au istoric familial pozitiv, fiind rezultatul unor mutaţii *de novo*. Transmiterea autosomal recesivă este întâlnită în circa 20-25% din cazuri. În această situaţie indivizii bolnavi sunt homozigoţi sau heterozigoţi compuşi. Dată fiind frecvenţa globală a bolii se apreciază că frecvenţa heterozigoţilor pentru asemenea mutaţii în populaţia generală ar fi de circa 1,4%.

Etiologia bolii este heterogenă, până în prezent fiind descrise drept cauză mutaţii la nivelul a cinci gene.

- Mutaţiile genei pentru *ankirina 1* (ANK1 – cromosomul 8p11.2) sunt responsabile pentru circa 50% din cazurile de boală, transmiterea fiind dominantă. Au fost descrise circa 40 de mutaţii, majoritatea nonsens sau cu decalarea cadrului de lectură şi absenţa produsului proteic.
- Mutaţiile *spectrinei* β (SPTB – cromosomul 14q22-q22.3) sunt identificate în circa 20% din cazuri, fiind asociate de asemeni cu o transmitere dominantă. Până în prezent au fost identificate cica 20 de mutaţii diferite.
- Mutatiile *schimbătorului de anioni tip 1* sau proteina bandă 3 (gena SLC4A1 – cromosomul 17q21-q22) determină circa 15-20% din cazuri, transmiterea fiind recesivă. Au fost identificate peste 50 de mutatii, multe dintre ele determinând substituţii ale unui singur aminoacid. Bolnavii sunt homozigoţi sau heterozigoţi compusi, tipul particular al mutaţiei influenţând major simptomatologia.
- Mutaţiile *proteinei 4.2* (gena EPB42 – cromosomul 15q15) sunt rare şi asociate cu transmitere recesivă.
- Mutaţiile *spectrinei* α (SPTA1 – cromosomul 1q21) sunt extrem de rare, asociază transmitere recesivă şi o simptomatologie foarte severă.

Diagnosticul prenatal este posibil atunci când se cunosc mutaţiile prezente în familie.

Sfatul genetic nu este atât de simplu cum pare la prima vedere datorită heterogenităţii genetice şi mutaţiilor noi.

Tratamentul substitutiv şi splenomegalia pot ameliora evoluţia bolii.

3.4 SINDROMUL EHLERS-DANLOS

Sindromul Ehlers-Danlos reuneşte un grup heterogen de boli genetice ale ţesutului conjunctiv caracterizate prin hipermobilitate articulară, extensibilitate articulara şi fragilitate tisulară. Sindromul Ehlers-Danlos este probabil una dintre cele mai frecvente boli genetice ale ţesutului conjunctiv, deşi frecvenţa sa este estimată foarte larg, între 1 la 5000 si 1 la 50.000

indivizi.

Manifestări clinice. In 1986 boala a fost clasificată clinic în tipurile I-VIII. Pentru majoritatea pacienilor semnele sunt minore şi ei rămân adeseori nediagnoscticaţi. În contrast, tipul vascular (tipul IV) poate conduce la moarte prematură în absenţa tratamentului chirurgical. Manifestările cutanate sunt considerate cardinale şi includ aspectul hiperextensibil (cutix laxa), cu textura moale, catifelată, apariţia escarelor atrofice şi a echimozelor. În tipul I de boală sunt prezente pliuri epicantice. Manifestarile articulare sunt prezente de asemeni în toate formele, putând ajunge până la dislocaţii ale şoldului în forma hipermobilă (tipul III) sau în artrocalazie (tipul VIIA si VIIB). Cifoscolioza pronunţată este patognomonică pentru tipul VI de boală. Anomaliile oculare precum keratoconusul, sclerele albastre, subluxaţia de cristalin sau dezlipirea retiniană sunt prezente de asemeni în toate tipurile dar au o severitate particulară în tipul VI. In sfârşit, ruptura prematură a membrabelor şi hemoragiile pre- sau postpartum sunt caracteristice în particular tipului clasic (I) sau vascular (IV) de boală.

Genetică. Sindromul Ehlers-Danlos se caracterizează prin heterogenitate genetică:

- Formele clasice de boală (tipurile I si II) sunt forme transmise dominant, determinate de mutaţii ale colagenului tip V (genele COL5A1 si COL5A2) sau, mai rar, ale colagenului tip I (COL1A1 – numai în tipul I).
- Tipul hipermobil (III) de boală este determinat de mutaţii ale colagenului tip III (COL3A1). Aceeaşi genă este implicată şi în producerea formei vasculare (IV) de boală, dar, mutaţiile implicate sunt diferite iar unele mutaţii produc fenotipuri mai severe decât altele.
- Tipul V de boală este caracterizat prin transmitere legată de X dar defectul molecular al bolii nu a fost încă identificat.
- Tipul VI de boala asociază transmitere recesivă şi este consecinţa mutaţiei genei pentru lizil hidroxilază (gena PLOD) implicată în modificarea posttranslaţională a colagenurilor tip I si III.
- Tipurile VIIA si VIIB sunt transmise dominant şi determinate de mutaţii ale genelor care codifică colagenul tip I (COL1A1 si COL1A2). Tipul VIIC este transmis recesiv şi determinat de mutaţiile unei procolagen proteinaze (gena ADAMTS2).
- Tipul VIII (cu periodontită) este transmis dominat, dar defectul molecular al bolii nu a fost încă identificat.

4. BOLI PRIN ANOMALII ALE PROTEINELOR IMPLICATE ÎN COMUNICAREA **INTERCELULARĂ ŞI CONTROLUL DEZVOLTĂRII.**

Semnalizarea intercelulară este o componentă esenţială a vieţii organismelor multicelulare, având un rol esenţial în cursul dezvoltării embrionare, precum şi în coordonarea activităţii tuturor celulelor pe tot parcursul vieţii.

Semnalizarea implică molecule extrem de diverse, dar o bună parte dintre acestea sunt proteinele. Există mai multe categorii de proteine care intervin în semnalizarea intercelulară şi controlul dezvoltării: proteine care mediază comunicarea intercelulară directă, hormoni peptidici şi factori de creştere, receptori, proteine implicate în transducţia intracelulară a semnalelor şi factori de transcripţie. Toate aceste proteine funcţionează în una din cele şapte căi majore de semnalizare identificate la organismele superioare şi om: calea WNT (*Wingless* – "fără aripi"), calea TGF-β (factorul de transformare a creşterii beta), calea HH (*Hedgehog* – "arici"), calea RTK (receptor tirozin kinazic), calea JAK/STAT (Janus kinaza/transductor al semnalului şi activator al transcripţiei), calea Notch ("*crestătura*") şi calea receptorilor nucleari.

- **Proteinele implicate în semnalizarea intercelulară directă** alcătuiesc unele structuri precum *joncţiunile gap* (formate din *conexine*) care permit schimbul rapid al unor molecule mici. De asemenea, *integrinele* şi *caderinele* discutate anterior nu funcţionează numai ca molecule de adeziune, dar şi ca molecule de semnalizare a interacţiunilor intercelulare.
- **Hormonii peptidici şi factorii de creştere** sunt molecule esenţiale de semnalizare la distanţă. Exemple cunoscute de *hormoni peptidici* sunt insulina, glucagonul şi hormonii hipofizari (hormonul de creştere, FSH, LH, prolactina etc.), la care se adaugă şi o serie de *neurohormoni* (endorfinele sau enkefalinele) care pot acţiona atât la distanţă cât şi ca neurotransmiţători la nivelul sinapselor neuronale. *Factorii de creştere* includ o largă varietate de molecule de semnalizare care controlează creşterea şi diferenţierea celulelor animale: NGF (factorul de

creştere neuronal), EGF (factorul de creştere epidermală), PDGF (factorul de creştere al plachetelor) etc. Un alt grup larg de factori de creştere polipeptidici sunt *citokinele* care controlează creşterea şi diferenţierea celulelor sanguine.

- **Receptorii** pot fi localizaţi intracelular (receptorii pentru hormonii steroizi, tiroxina, acidul retinoic, etc.), dar majoritatealor sunt localizaţi la nivelul membranei plasmatice. In funcţie de caracteristicile structurale **receptorii membranari** pot fi clasificaţi în patru clase majore: receptori cuplaţi cu proteine le G (receptorii pentru epinefrină, serotonină sau glucagon), receptori – canale ionice (receptorul acetilcolinic), receptori asociaţi unor tirozin kinaze (receptorii pentru majoritatea citokinelor, interferoni şi hormonul de creştere) şi receptori cu activitate enzimatică intrinsecă (receptorii pentru insulină, EGF, PDGF, TGF-beta etc.). Receptorii pot fi clasificaţi de asemeni în funcţie de tipul de ligand în receptori hormonali, receptori ai citokinelor sau clase speciale de receptori, cum sunt cei ai unor metaboliti (LDL) sau receptorii pentru lumina etc.
- **Proteinele implicate în transductia semnalului** pot fi clasificate în trei clase principale: proteine cu activitate GTP-azică (proteinele trimerice G ataşate direct unor receptori şi proteinele monomerice din familia RAS), proteine care reglează fosforilarea (protein kinaze şi protein fosfataze) şi proteine adaptor (care nu au activitate catalitică proprie dar mediază interacţiunea altor proteine prin intermediul unor domenii de legare ca, de pilda, domeniile SH2 ale proteinelor STAT ce leagă grupările fosfotirozinice ale altor proteine).
- **Factorii de transcripţie** au fost descrişi pe larg în capitolul 4. Ei pot fi clasificaţi în funcţie de conformaţia tridimensională în mai multe clase: proteine cu "degete de zinc", proteine cu "fermoare leucinice", proteine homeodomeniu, etc. Multe dintre acestea au un rol esenţial în controlul dezvoltării în perioada embrionara.

Mutaţiile genelor ce codifică proteine implicate în semnalizarea intercelulară şi în controlul dezvoltării sunt extrem de numeroase în patologia umană. Pentru a avea o vedere "panoramică" asupra acestei categorii de boli moleculare, în tabelul 11.4 am inclus câteva dintre cele mai frecvente clase şi boli monogenice produse prin mutaţii ale unor asemenea proteine, precizând codul OMIM prin care doritorii pot obţine informaţii suplimentare. Ele sunt grupate în următoarele categorii:

- boli produse prin anomalii ale unor proteine implicate în semnalizarea intercelulară directă;
- boli produse prin anomalii ale unor hormoni şi factori de crestere;
- boli produse prin anomalii ale unor receptori;
- boli produse prin anomalii ale unor proteine implicate în transducţia semnalului;
- boli produse prin anomalii ale unor factori de transcriptie.

În rest ne vom limita la descrierea a două dintre cele mai frecvente boli genetice: hipercolesterolemia familială, determinată de mutaţii ale receptorului LDL, neurofibromatoza şi boala polichistică renală a adultului (ADPKD), produsă prin mutaţii ale unor gene implicate în semnalizarea celulară

Tabelul 11.4 Exemple de boli monogenice produse prin anomalii ale unor proteine implicate în semnalizarea intercelulară şi controlul dezvoltării

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Boli produse prin mutaţii ale unor proteine implicate în semnalizarea intercelulară directă				
Conexina 26	GJB2	13q11-q12	Surditatea neurosenzorială nonsindromică AR	220290
Conexina 30	GJB6	13q12	Displazia ectodermală hidrotică	129500
Conexina 31	GJB3	1p35.1	Eritrokeratodermia variabilă	133200
Conexina 32	GJB1	Xq13.1	Boala Charcot-Marie-Tooth legată de X	
Conexina 43	GJA1	6q21-q23.2	Displazia oculodentodigitală	164200
Conexina 46	GJA3	13q11	Cataracta zonulara pulverulentă	601885
Boli produse prin mutaţii ale unor hormoni şi factori de crestere				
Hormonul de crestere	GH1	17q22-q24	Deficit izolat al hormonului de creştere tip IA	262400
Hormonul paratiroidian	PTH	11p15.3-p15.1	Hipoparatiroidismul familial izolat AD	146200
Insulina	INS	11p15.5	Hiperproinsulinemia familială	176830

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Hormonul antimullerian	AMH	19p13.3-p13.2	Sindromul de persistenţă al ductelor mulleriene tip I	261550
Arginin vasopresina	AVP	20p13	Diabetul insipid central familial	125700
Proopiomelanocortina	POMC	2p23.3	Obezitate, insuficienţa adrenaliană, par roşcat	176830
Peptidul insulin-like tip 3	INSL3	1p913.2	Criptorhidismul idiopatic	219050
Factorul de creştere fibroblastică tip 14	FGF14	13q34	Ataxia cerebelară AD	601515
Factorul de creştere al celulelor endoteliale derivat din plachete	ECGF1	22q13.32-qter	Sindromul encefalomiopatiei mioneuro-gastrointestinale	603041
Factorul indus de TGF-beta	TGIF	18p11.3	Holoprosencefalia tip 4	142946
Boli produse prin mutaţii ale unor receptori				
Receptorul androgenic	AR	Xq11-q12	Sindromul Morris	300068
Receptorul pentru vitamina D	VDR	12q12-q14	Rahitismul vitamino-D rezistent tip IIA	277440
Receptorul pentru factorul de creştere	GHR	5p13-p12	Sindromul Laron	262500
Receptorul pentru hormonul paratiroidian	PTHR1	3p22-p21.1	Condrodisplazia metafizeala tip Murk Jansen	156400
Receptorul pentru insulina	INSR	19p13.2	Diabetul zaharat insulino-rezistent cu acanthosis nigricans	146670
Receptorul pentru aldosteron	HR3C2	4q31.1	Pseudohipoaldosteronismul tip I	177735
Receptorul pentru hormonul l luteinizant/coriogonadotropina	LHCGR	2p21	Pubertatea masculină precoce familială	176410
Receptorul pentru lipo-proteinele cu densitate joasă	LDLR	19p13.2	Hipercolesterolemia familială	143890
Membrul 1A al superfamiliei receptorilor pentru TNF	TNFR5F1A	12q13.2	Febra periodică familială AD	142680
Receptorul tip 1 pentru factorul de creştere fibroblastică	FGFR1	8p11.2-p11.1	Sindromul Kallmann tip 2	147950
Receptorul tip 2 pentru factorul de creştere fibroblastica	FGFR2	10q26	Sindromul Crouzon Sindromul Apert Sindromul Pfeiffer Cutis gyrata Sindromul Jackson-Weiss	123500 101200 101600 123790 123150
Receptorul tip 3 pentru factorul de creştere fibroblastică	FGFR3	4p16.3	Acondroplazia Displazia tanatoforică	134934 187600
Lanţul gamma al receptorului pentru interleukina tip 2	IL2RG	Xq13	Sindromul de imunodeficienţă combinată severă (SCID) legată de X	308380
Polipeptidul alfa-1 al receptorului colinergic nicotinic	CHRNA1	2q24-q32	Sindromul miastenic congenital	601462
Polipeptidul alfa-4 al receptoru-lui colinergic nicotinic neuronal	CHRNA4	20q13.2-q13.3	Epilepsia nocturna de lob frontal tip 1	600513
Rodopsina	RHO	3q21-q24	Retinita pigmentară	180380
Boli produse prin mutaţii ale unor proteine implicate în transducţia semnalului				
Subunitatea alfa stimulatorie a proteinei de legare a GDP	GNAS	20q13.2	Pseudohipoparatiroidismul tip IA Osteodistrofia ereditară Albright	103580
Polipeptidul 1 cu activitate alfa transducatoare a proteinei G	GNAT1	3p21	Cecitatea nocturna congenitală staţionară	163500
Polipeptidul 2 cu activitate alfa transducătoare a proteinei G	GNAT2	1p13	Acromatopsia	216900
Neurofibrina	NF1	17q11.2.	Neurofibromatoza 1	162200
Proteina STAT tip 1	STAT1	2q32.2-q32.3	Infecţia familială diseminată cu micobacterii atipice	209950
Janus kinaza tip 3	JAK3	19p13.1	SCID AR tip T negativ/B pozitiv	600802

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Serin treonin kinaza tip 11	STK11	19p13.3	Sindromul Peutz-Jeghers	175200
Boli produse prin mutaţii ale unor factori de transcriptie				
Proteina de legare la CREB	CREBBP	16p13.3	Sindromul Rubinstein-Taybi	180849
Omologul 2 al proteinei "empty spiracles" de la Drosophila	EMX2	10q26.1	Schizencefalia	269160
Membrul 3 al familiei proteinelor Gli-Kruppel	GLI3	7p13	Cefalosinpolidactilia (sindromul Grieg) Sindromul Pallister-Hall Polidactilia postaxială tip A1	175700 146510 174200
Proteina homeobox A11	HOXA11	7p15-p14.2	Sinostoza radioulnara cu trombocitopenie amegacariocitica	605432
Proteina homeobox A13	HOXA13	7p15-p14.2	Sindromul mână-picior-organe genitale	140000
Proteina homeobox D13	HOXD13	2q31-q32	Sinpolidactilia	186000
Proteina Lim homeobox 1 beta	LMX1B	9q34.1	Sindromul unghii-rotulă	161200
Factorul de transcripţie asociat microftalmiei	MITF	3p14.1-p12.3	Sindromul Waardenburg tip IIA	193510
Omologul 1 al genei homeobox din segmentul muscular de la Drosophila	MSX1	4p16.1	Hipodontia autosomal dominantă	106600
Omologul 2 al genei homeobox din segmentul muscular de la Drosophila	MSX2	5q34-q35	Craniosinostoza tip Boston	604757
Proteina "paired box" tip 2	PAX2	10q24.3-q25.1	Sindromul hipoplazie renală – colobom	120330
Proteina "paired box" tip 3	PAX3	2q35	Sindromul Waardenburg tip 1	193500
Proteina "paired box" tip 6	PAX6	11p13	Aniridia	106210
Proteina "paired box" tip 8	PAX8	2q12-q14	Disgenezia tiroidiana	218700
Proteina "paired box" tip 9	PAX9	14q12-q13	Oligodontia	604625
Proteina "paired like" tip 2	PITX2	4q25-q26	Sindromul Rieger	180500
Proteina "sal like" tip 1	SALL1	16q12.1	Sindromul Townes-Brocks	107480
Proteina "sonic hedgehog"	SHH	7q36	Holoprosencefalia tip 3	142945
Proteina SRY-box tip 9	SOX9	17q24.3-q25.1	Displazia campomelică	114290
Proteina SRY-box tip 10	SOX10	22q13	Sindromul Waardenburg-Shah	277580
Proteina T-box tip 3	TBX3	12q24.1	Sindromul mamaro-ulnar	181450
Proteina T-box tip 5	TBX5	12q24.1	Sindromul Holt-Oram	142900
Proteina Treacher-Collins 1	TCOF1	5q32-q33.1	Sindromul Treacher-Collins	154500
Proteina WT1	WT1	11p13	Sindromul Denys-Drash Sindromul Frasier	194080 136680

4.1. HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIALĂ

Definiţie. Hipercolesterolemia familială (OMIM 143890)este o boală transmisă autosomal dominant, determinată de mutaţii ale receptorului membranar pentru LDL, responsabil de legarea şi internalizarea LDL, principală proteină de transport a colesterolului plasmatic.

Incidenţa. Forma homozigotă de boală este rară, cu incidenţa de 1 la un milion, dar forma heterozigotă reprezintă una dintre cele mai frecvente boli monogenice, cu o frecvenţă de cel puţin 1 la 500[3]. Se consideră ca până la 5% din indivizii cu hipercolesterolemie din populaţia generală sunt heterozigoţi pentru o mutaţie LDLR.

Simptomatologie. Hipercolesterolemia familială (HF) este încadrată împreună cu alte boli în categoria hiperlipoproteinemiilor tip 2, fiind caracterizată prin creşterea LDL plasmatic şi dezvoltarea *prematură* a plăcilor de aterom la nivelul arterelor (care determină boală coronariană

[3] Frecvenţa crescută a HF s-ar putea explica explica prin avantajul selectiv al heterozigoţilor la anumite boli infecţioase (de ex. hepatita)

precoce), a xantoamelor (depozite de colesterol la nivelul tegumentelor şi tendoanelor) şi arcurilor corneene (depozite de colesterol la periferia corneei). Simptomatologia clinică este prezentă atât la heterozigoţi cât şi la homozigoţi, dar manifestările clinice sunt mult mai severe şi apar mai precoce la homozigoţi ("efect de dozaj genic"), care prezintă boală coronariană semnificativă încă din copilărie şi decedează înainte de 30 de ani.

Patogenie. Colesterolul este un component lipidic esenţial al membranelor şi precursor al hormonilor steroidieni şi al sărurilor biliare. Principala formă de transport a colesterolului plasmatic este LDL (*low density lipoprotein*). Receptorul pentru LDL (LDLR) recunoaşte apoproteina B-100, principala componentă proteică a LDL, precum şi apo E, o proteină prezentă în VLDL, IDL şi chilomicroni. LDLR este localizat la nivelul unor zone ale suprafeţei celulare care au aspectul unor mici depresiuni, îmbrăcate pe faţa internă cu proteina *clatrină*. Legarea Apo B-100 determină internalizarea complexului LDL-receptor (endocitoză) şi, după cuplarea cu lizozomii, are loc eliberarea colesterolului liber în citoplasmă şi reciclarea receptorului, care va reajunge la nivelul membranei.

> LDLR are patru domenii funcţionale: domeniul de legare la LDL, un domeniu de omologie cu EGF (factorul de creştere epidermală) necesar pentru disocierea receptorului, cuplat la LDL, la nivelul endosomilor şi reciclarea lui, un domeniu transmembranar şi un domeniu ţintă pentru regiunile membranei plasmatice îmbrăcate cu clatrină.

Mutaţiile LDLR determină creşterea LDL-colesterolului plasmatic, care generează ateroscleroza.

Genetică. Aşa cum am precizat, HF se transmite ereditar autosomal dominant; bolnavii sunt deobicei heterozigoţi dar – datorită frecvenţei crescute a bolii – se pot întâlni şi homozigoţi, care fac mai precoce o formă gravă de boală, dovedind existenţa unui clar efect de dozaj genic (numărul de receptori LDL fiind mult mai redus decât la heterozigoţi).

Au fost descrise peste 400 de mutaţii ale genei LDLR care sunt localizate pe toată lungimea genei. Circa 2-10% din totalul alelelor mutante din populaţie sunt reprezentate de deleţii sau inserţii mari, iar restul mutaţiilor sunt substituţii nucleotidice, deleţii sau inserţii mici. În unele populaţii cu o mare prevalenţă a bolii există deobicei o mutaţie frecventă, din cauza *efectului de fondator*. Din punct de vedere al consecinţelor pe care le au asupra funcţiei receptorului se pot deosebi cinci clase de mutaţii.

> Mutaţiile de clasa 1 sunt mutaţii care împiedică sinteza oricărei proteine şi sunt determinate de deleţii ori mutaţii care alterează stabilitatea ARNm. Ele sunt cele mai frecvente mutaţii la nivelul acestui locus.
> Mutaţiile de clasa 2 sunt relativ frecvente şi alterează capacitatea de plicaturare corectă a proteinei, ceea ce impiedică transportul său de la nivelul reticulului endoplasmatic la nivelul aparatului Golgi şi acumularea sa la nivelul primului sediu.
> Mutaţiile de clasa 3 sunt compatibile cu localizarea membranară a receptorului, dar determină incapacitatea de legare a LDL.
> Mutaţiile de clasa 4 afectează localizarea corectă a receptorului în regiunile membranare îmbrăcate în clatrină şi, ca urmare, complexul receptor-LDL nu poate fi internalizat. In sfârşit, mutaţiile de clasa 5 interesează domeniul de omologie cu EGF si, ca urmare, alterează capacitatea de reciclare a receptorului.

Factorii de mediu (în special alimentaţia bogată în colesterol şi acizi graşi saturaţi), sexul masculin şi fondul genetic individual (în care se pot găsi *gene modificatoare*) pot influenţa efectul mutaţiilor LDLR asupra nivelului plasmatic al colesterolului şi deci producerea aterosclerozei.

Diagnosticul de HF se bazează pe evidenţierea unui nivel crescut de LDL-colesterol plasmatic , prezenţa xantoamelor sau bolii coronariene precoce şi un istoric familial pozitiv. Diagnosticul molecular este dificil datorită numărului mare de mutaţii dfierite ce produc boala dar nu aduce informaţii suplimentare pentru prognostic sau tratament

Tratament. Obiectivul principal este scăderea importantă a nivelului LDL- colesterolului plasmatic prin dieta săracă în grăsimi şi tratament hipocolesterolemiant (cu statine).

4.2. NEUROFIBROMATOZELE

Neurofibromatozele sunt boli genetice care asociază o predispoziţie pentru dezvoltarea unor tumori benigne şi maligne cu originea în celule ale sistemului nervos. Neurofibromatoza tip 1 şi neurofibromatoza tip 2 sunt boli distincte clinic şi genetic.

Neurofibromatoza tip 1 – OMIM 162200 (denumită anterior boala von Recklinghausen) este o boală transmisă autosomal dominant cu o incidenţă de 1 la 3000 indivizi în populaţia generală.

*Diagnosticul clini*c al bolii necesită prezenţa a două sau mai multe dintre urmatoarele criterii: pete café-au-lait; două neurofibroame sau un neurofibrom plexiform; pistrui axilari sau inghinali multipli; displazia aripilor sfenoidului sau încurbarea ori subţierea congenitală a cortexului oaselor lungi; glioame bilaterale ale nervului optic; două sau mai multe hamartoame iriene (noduli Lisch); o rudă de gradul întâi cu neurofibromatoză 1 (diagnosticată şi ea conform acestor criterii). Pe lângă leziunile amintite mai sus, purtătorii mutatiilor NF1 au un risc moderat pentru dezvoltarea unor tumori precum neurofibrosarcoame, feocromocitoame, tumori carcionide duodenale, neuroblastoame, ependimoame, rabdomiosarcoame şi tumori Wilms. Copiii cu neurofibromatoză tip 1 au risc crescut pentru leucemia mielomonocitară tipul juvenil şi pentru mielodisplazie.

Genetică. Boala este determinată de mutaţtii ale genei NF1 localizată pe cromosomul 17q11.2. NF1 este o genă mare (circa 300 kb), alcatuită din 59 de exoni, care codifică o proteină cu activitate GTP-azică numita *neurofibromina*. Această proteină reglează negativ semnalele transduse pe calea proteinelor RAS, acţionând ca o proteină supresoare de tumori. Au fost descrise numeroase mutaţii la nivelul acestei gene, cele mai multe dintre ele (70-80%) fiind mutaţii care determină trunchieri ale proteinei. Ca urmare, a fost dezvoltată o metodă de diagnostic genetic bazată pe testul proteinelor trunchiate. O treime până la jumatate din totalul cazurilor apar ca fiind sporadice, ele fiind determinate de mutaţii de novo.

Există puţine recomandari eficace pentru mangementul pacienţilor cu neurofibromatoză tip 1. Printre acestea se numara măsurarea tensiunii arteriale de două ori pe an (datorită riscului dezvoltării unor feocromocitoame) şi investigaţia clinică a simptomelor neurologice (cefalee, surditate, tulburari ale vederii).

Neurofibromatoza tip 2 – OMIM 101000 este de asemeni o boală transmisă autosomal dominant, cu o incidenţă de aproximativ 1 la 35.000 de indivizi în populaţia generală.

Diagnosticul clinic necesită fie prezenţa unor tumori vestibulare bilaterale, fie a unei rude de gradul întâi cu neurofibromatoză tip 2 la un pacient care prezinta unul din urmatoarele semne: tumoră vestibulară unilaterală; un neurofibrom plexiform, două sau mai multe neurofibroame; două sau mai multe glioame; două sau mai multe meningioame; cataractă subcapsulară posterioară la o vârstă tânăra; dovada imagistică a prezenţei unei tumori intracraniene sau la nivelul măduvei spinării. Pacienţii au risc de dezvoltare a unor tumori benigne ale SNC; datorită localizării au însă o morbiditate si o mortalitate crescute. Din punct de vedere al severităţii simptomelor şi vârstei de debut se deosebesc doua forme: forma Gardner sau moderată si forma Wishart, severă.

Genetică. Boala este determinată de mutaţiile genei NF2 localizată pe cromosomul 22q12.2 care este alcatuită din 17 exoni ce ocupă 90 kb. Gena codifică o proteină numita *merlina* sau schwannomina care interacţionează cu proteina transmembranară CD44 şi cu citoscheletul actinic şi îşi realizează funcţia sa de supresie tumorală prin asigurarea menţinerii normale a structurii citoscheletului şi reducerea capacităţilor de motilitate şi adeziune celulară. Circa 50% dintre pacienţi nu au istoric familial pozitiv, iar aceste cazuri sunt considerate a fi consecinţa fie a unor mutaţii de novo, fie a mozaicismului germinal. Penetranţa acestor mutaţii este foarte crescută, peste 95% din purtători dezvoltând simptome clinice până la vârsta de 50 de ani. Majoritatea mutaţiilor determină trunchierea proteinei, iar acestea asociază de regulă simptome

mai severe şi debut precoce.

Screening-ul clinic al rudelor de gradul întâi ale pacienţilor includ examinarea neurologică anuală, inclusiv examenul oftalmologic şi al capacităţii auditive. Este disponibil de asemenea diagnosticul genetic.

4.3. BOALA POLICHISTICĂ RENALĂ AUTOSOMAL DOMINANTĂ

Boala polichistică renală a adultului (ADPKD) este o boală multisistemică ereditară, produsă de mutaţii dominante ale unor gene autosomale, manifestată deobicei la adult şi caracterizată prin chişti renali multipli, bilaterali, care se asociază variabil cu anomalii extrarenale, în deosebi hepatice şi cardiovasculare. ADPKD este una din cele mai frecvente boli ereditare la om, având o prevalenţa de circa 1 la 1000.

Manifestările clinice ale ADPKD debutează deobicei în a treia - a patra decadă de viaţă dar chiştii pot fi depistaţi încă din copilărie, fiind mult timp asimptomatici. Atunci când ating anumite dimensiuni, boala poate fi sugerată de dureri lombare şi nefromegalie: Manifestările extrarenale sunt reprezentate de chişti hepatici, hipertensiune arterială (secundară ischemiei renale), prolaps de valvă mitrală, amevrisme intracraniene. Boala evoluiază frecvent spre insuficienţă renală cronică (IRC) terminală, necesitând terapie de supleere a funcţiei renale.

Diagnosticul pozitiv este deobicei uşor la adult: rinichi mari (bilateral) cu chişti multipli, prezenţa chiştilor în ficat, anamneza familială pozitivă şi sugestivă pentru transmitere autosomal dominantă. Existenţa altor boli chistice renale – genetice sau negenetice – impune un *diagnostic diferenţial* atent, mai ales în două situaţii: copil cu boală chistică renală, situaţie în care pentru a stabili dacă este vorba de ADPKD sau ARPKD se va determina prezenţa sau absenţa bolii la unul dintre părinţi; alte boli renale chistice cu transmitere autosomal dominantă, cum ar fi boala renală glomerulochistică sau scleroza tuberoasă.

Genetică. Boala polichistică renală a adultului este o boală ereditară cu transmitere autosomal dominantă, penetranţă dependentă de vîrstă şi expresivitatea variabilă manifestă prin anomalii renale şi extrarenale variate la bolnavi diferiţi.

Prin studii familiare şi moleculare de înlănţuire genică au fost identificate, la diferite familii cu ADPKD, trei gene: PKD1 (prezentă la circa 85% din bolnavi), PKD2 (15% bolnavi) şi PKD3 (în câteva familii).

- Gena PKD 1 fost localizată cromosomuli 16p13.3) şi secvenţializată, stabilindu-se că regiunea codantă (alcătuită din 46 exoni) o glicoproteină membranară multifuncţională, numită *policistina 1,* care ar putea avea un rol în interacţiunea celulă-celulă sau celulă-proteine din matricea extracelulară, funcţionând ca un *receptor*.
- Gena PKD 2 a fost localizată în regiunea 4q 21-22) şi secvenţializată. Regiunea codantă are numai 15 exoni, codificând o proteină membranră, cu numai 968 de aminoaciz, numită *policistina 2* care funcţionează probabil ca un *canal de calciu.*
- Gena PKD 3. S-au descris cîteva familii cu ADPKD la care boala nu este determinată de mutaţii în genele PKD 1 sau PKD 2 (Daoust et al, 1995). Gena PKD 3 nu a fost încă localizată.

Patogenie. Produsele genelor PKD – policistina 1 şi 2 - interacţionează şi pot participa la o cale comună de formare a chiştilor renali. Se crede că policistina 1 ar funcţiona ca un receptor pentru un ligand necunoscut din matricea extracelulară care controlează sau mediază o cale de semnalizare ce comunică celulelor epiteliale informaţia poziţională necesară în structura nefronului. In această cale ar acţiona şi policistina 2. Mutaţia genei PKD 1 ar duce, prin absenţa policistinei 1, la pierderea funcţiei şi deci la absenţa semnalului; acest fapt ce duce la modificarea programului de diferenţiere celulară. In acest caz, celula nu poate să-şi menţină structura tubulară normală, creşte rata de prolifarare şi apar o serie de modificări membranare care, împreună cu remodelarea membranei bezală duc la formarea chiştilor.

Ipoteza patogenică descrisă mai sus nu explică una din caracteristicile fundamentale ale ADPKD: deşi toate celulele renale au mutaţia genei PKD 1 (în stare heterozigotă, An), chiştii se

formează numai la 1-2% din nefroni iar nefronii afectaţi au numai un anumit segment dilatat. O explicaţie posibilă, propusă de Qian et al (1996), se bazează pe modelul "dublei lovituri" din biologia tumorală: bolnavul se naşte heterozigot (An), moştenind o genă PKD1 mutantă de la unul din părinţi; existenţa unei singure gene mutante nu este însă suficientă pentru formarea chistului. În timpul vieţii se produce, în anumite celule, "pierderea heterozigozităţii (prin mutaţia somatică sau inactivarea celei de a doua gene). Celulele dublu mutante (AA) nu produc deloc policistină, dispare semnalul necesar menţinerii stării de diferenţiere şi începe proliferarea şi formarea unei clone ce alcătuieşte chistul.

Rămîne de răspuns la o ultimă întrebare: cum se explică efectele multiple (pleiotrope) ale genelor PKD? Manifestările renale şi extra renale din ADPKD au fost considerate expresia unor perturbări ale matricei extracelulare şi interacţiunii sale cu celulele.

Diagnosticul genotipic. Localizarea şi identificarea genelor PKD1 şi PKD2 au deschis drumul diagnosticului genotipic al ADPKD care poate tranşa diagnosticul bolii la orice vîrstă (inclusiv la făt) şi evident atunci cînd imagistica nu o poate face (absenţa unor chişti renali detectabili sau imagini incerte). Metodele de analiză moleculară permit diagnosticul ADPKD fie prin analiza directă a genei fie prin identificarea unor markeri ADN polimorfici situaţi în vecinătatea genei şi transmişi împreună cu aceasta (“tehnici de înlănţuire genică”). Testarea genetică este indicată în două situaţii: stabilirea statusului genetic la tinerii peste 18 ani, cu risc de 50% (cînd ecografia nu poate evidenţia totdeauna chiştii), care în funcţie de rezultat pot lua o decizie informată în planingul lor familial; evaluarea unui donator sănătos înrudit cu pacientul care va fi transplantat.

5. BOLI ALE PROTEINELOR IMPLICATE ÎN CONTROLUL HOMEOSTAZIEI EXTRACELULARE.

Homeostazia (în greaca veche – *a rămâne la fel*) este definită ca fiind capacitatea organismului de autoreglare dinamică prin care îşi menţine variabilele esenţiale în limite acceptabile pentru propria sa structură şi funcţionare, ca răspuns la perturbările induse de mediu (Cannon 1932). Proteinele au un rol esenţial în menţinerea homeostaziei organismului. Principalele procese implicate în controlul homeostaziei extracelulare sunt: apărarea imună, hemostaza şi inhibiţia protează.

- **Proteinele responsabile de apărarea imună** fac parte din mai multe categorii funcţionale ca de exemplu proteinele sistemului major de histocompatibilitate, proteinele sistemului complement, imunoglobulinele, receptorii de suprafaţă ai limfocitelor, diverse citokine. Toate aceste clase de proteine şi funcţiile lor vor fi detaliate în capitolul 16.
- **Proteinele implicate în hemostază** pot fi clasificate în *factori de coagulare plasmatici* (factorii de coagulare I – XIII, proteina C, proteina S şi TFPI – inhibitorul căii factorului tisular), *factori de coagulare plachetari* şi *factori de coagulare ai suprafetei celulare* (tromboplastina tisulară şi trombomodulina), *factori ai trombolizei*, la care se adaugă o serie de factori activatori şi inhibitori ai componentelor amintite (activatorul tisular al plasminogenului – PLAT – sau inhibitorul activatorului plasminogenului – PAI).
- **Proteinele implicate în inhibiţia proteazelor** fac parte din câteva familii importante cum sunt cele ale inhibitorilor proteazici (PI1 – PI14), inhibitorii tisulari ai metaloproteinazelor (TIMP), inhibitorii proteazelor serinice (SPINK şi SPINT) etc.

In cele ce urmează vom aminti doar câteva exemple de boli genetice produse prin mutaţii ale unor proteine implicate în controlul homeostaziei extracelulare (tabelul 11.5) şi vom descrie o boală reprezentativă pentru această clasă: hemofilia A (vezi caseta 11.7).

Tabelul 11.5. Exemple de boli produse prin mutaţii ale unor proteine implicate în controlul homeostaziei extracelulare

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Boli produse prin mutaţii ale unor proteine implicate în apărarea imună				
Factorul properdinic C	PFC	Xp11.4-p11.23	Deficienţa de properdina legată de X	312060
Componenta C2 a complementului	C2	6p21.3	Deficienţa componentei C2 a complementului	217000
Proteina Wiscott-Aldrich	WAS	Xp11.23-p11.22	Sindromul Wiscott-Aldrich	301000
Tirozinkinaza Bruton	BTK	Xq21.3-q22	Agammaglobulinemia Bruton	300300
Proteinele de activare ale recombinării 1 şi 2	RAG1 RAG2	11p13	Sindromul Omenn	603554
Reglatorul traficului lizozomal	LYST	1q42.1-q42.2	Sindromul Chediack-Higashi	214500
Polipeptidul beta al citocromului B-245	CYBB	Xp21.1	Boala granulomatoasa cronica	306400
Boli produse prin mutaţii ale unor proteine implicate în controlul hemostazei				
Factorul V Leiden	F5	1q23	Deficitul factorului V	227400
Factorul VII al coagularii	F7	13q24	Deficitul factorului VII	227500
Factorul VIII al coagulării	F8C	Xq28	Hemofilia A	306700
Factorul IX al coagulării	F9C	Xq27.1-q27.2	Hemofilia B	306900
Factorul XI – tromboplastina	F11	4q35	Deficienţa PTA	264900
Factorul XII al coagulării	F12	5q33-qter	Deficienţa factorului Hageman	234000
Factorul von Willebrand	VWF	12p13.3	Boala von Willebrand	193400
Proteina C	PROC	2q13-q14	Boala trombotică congenitală determinată de deficienţa proteinei C	176860
Boli produse prin mutaţii ale unor inhibitori proteazici				
Alfa-1 antitripsină	PI	14q32.1	Deficienţa de alfa-1 antitripsina	107400
Inhibitorul 3 al metaloproteinazelor tisulare	TIMP3	22q12.1-q13.2	Distrofia maculara pseudoinflamatorie tip Sorby	136900
Inhibitorul proteazic tip 12	PI12	3q26	Encefalopatia familială cu incluzii de serpină	604218
Inhibitorul plasminei	PLI	7pter-p12	Deficitul inhibitorului plasminei	262850
Inhibitorul componentei C1 a complementului	CINH	11q11-q13.1	Angioedemul ereditar	106100

5.1. HEMOFILIA A

Hemofilia A (OMIM 306700) este o tulburare a coagulării transmisă legat de X, determinată de o deficienţă a factorului VIII plasmatic al coagulării. Factorul VIII al coagulării are rolul de cofactor al factorului IX, o protează care reglează activarea factorului X.

Incidenţa. Hemofilia A are o incidenţă de aproximativ 1 la 5000-10000 de nou născuti de sex masculin.

Simptomatologie. Manifestările clinice sunt prezente de regulă la indivizi de sex masculin, deşi există şi cazuri rare în care apar manifestări clinice la femei care au inactivare preferenţială a cromosomului X fără mutaţie. Boala este caracterizată prin hemoragii la traumatisme minime care pot persista pe durata a câtorva ore sau zile şi care conduc la formarea de hematoame la nivelul ţesuturilor moi şi muşchilor, precum şi a hemoragiilor intraarticulare care evoluează spre artroza. Formele severe de boală sunt diagnosticate în perioada neonatală datorită prezenţei unor hematoame cefalice excesive sau a hemoragiei prelungite la nivelul cordonului ombilical. Formele moderate dezvoltă hematoame şi hemartroze o dată cu începutul mersului, în timp ce în formele minore diagnosticul poate fi pus cu ocazia unor intervenţii chirurgicale sau a unor traumatisme.

Diagnostic. Diagnosticul se bazează în mod curent pe măsurarea activităţii factorului VIII al coagulării. Diferenţierea trebuie făcută în primul rând de hemofilia B, determinată de mutaţii

ale genei pentru factorul IX al coagulării. Această boală este identică din punct de vedere clinic, dar incidenţa este mai redusă (1 la 100.000). In funcţie de nivelul activităţii factorului VIII hemofilia A poate fi clasificată în forma uşoară (activitate restanta de 5-25%), forma moderată (activitate restantă de 1-5%) şi forma severă (activitate restantă sub 1%).

Genetică. Hemofilia A este determinată de mutaţii ale genei F8C localizată la nivelul cromosomului Xq28. Mutaţiile sunt extrem de variate şi includ deleţii, inserţii, inversii şi mutaţii punctiforme. Cea mai frecventă mutaţie - care este responsabilă de aproximativ 25% din cazurile de boală şi circa 40-50% din formele severe - este o inversie ce asociază şi o deleţie a porţiunii carboxiterminale a factorului VIII. Această inversie apare ca urmare a unui proces de recombinare intracromosomică neomologă între secvenţe localizate la nivelul intronului 22 al genei şi secvenţe situate telomeric faţă de genă. O altă categorie de mutaţii asociate cu forme severe de boală sunt inserţiile unor elemente retrotranspoabile L1 în interiorul genei. Dintre mutaţiile punctiforme, cele asociate unor forme severe sau moderate de boală sunt cele care determină apariţia unor codoni stop prematuri, mutaţiile care alterează capacitatea de legare a factorului VIII la factorul von Willebrand sau la factorul IX al coagulării ori mutaţiile care afectează capacitatea proteinei de a fi secretată.

Tratamentul standard actual constă în înlocuirea intravenoasă a factorului VIII. Acest tratament a permis prelungirea speranţei de viaţă de la sub 2 ani la începutul secolului XX la circa 65 de ani în prezent. Transplantul hepatic (locul de sinteza al factorului VIII) este o metoda utilizată în situaţii rare. Există mari speranţe pentru implementarea în viitor a unor metode de terapie genică.

Sfat genetic. Dacă o femeie are istoric familial de hemofilie, statusul sau purtător poate fi determinat prin analize de înlănţuire sau prin screening-ul mutaţiei F8C atunci când mutaţia a fost identificată deja la o rudă. Există şi teste care pot fi utilizate pentru analiza prezentei celei mai frecvente mutaţii, inversia mai sus amintită. Determinarea statusului de purtător prin metode enzimatice este dificilă. Dacă femeia este purtătoare, ea are un risc de 50% de a da naştere unor băieti bolnavi şi un risc egal de a da naştere unor fete purtătoare. Având în vedere frecvenţa inactivării preferenţiale a cromosomului X există şi un risc mic de a se naşte o fată cu simptome de hemofilie. In cazurile în care mama are un băiat cu hemofilie dar nu există istoric familial pozitiv trebuie luata în calcul posibilitatea unor mutaţii de novo care sunt responsabile pentru circa 1/3 din cazurile de boală. In acest caz riscul de recurenţă a bolii este în general mai mic (posibilitatea unui mozaicism germinal).

D. BOLI GENETICE PRODUSE PRIN MUTAŢII DINAMICE

In 1991 au apărut primele rapoarte privind implicarea expansiunii unor repetiţii trinucleotidice în etiologia a două boli genetice: repetiţia CGG în cazul sindromului X-fragil şi repetiţia CAG în cazul atrofiei musculare spinobulbare (boala Kennedy). In ambele cazuri s-a constatat că pe măsură ce gena trece de la o generaţie la alta, numărul de repetiţii trinucleotidice creşte progresiv, suferă o *expansiune* (de aici şi numele de mutaţii dinamice sau instabile), şi când depăşeşte un *anumit prag critic* produce anomalii în expresia genei sau funcţia proteinei codificată de genă, care determină starea de boală. De asemenea s-a constatat că există o strânsă corelaţie între creşterea numărului acestor repetiţii şi apariţia mai precoce şi severitatea mai mare a manifestărilor clinice. Ulterior s-a dovedit ca acest mecanism al mutaţiilor dinamice este caracteristic şi altor boli genetice, astfel ca în prezent se poate vorbi clar despre o nouă clasă de boli genetice: bolile produse prin mutaţii dinamice, instabile sau prin expansiunea unor repetiţii simple, cel mai frecvent trinucleotide. In prezent lista acestor boli cuprinde cel puţin 15 entităţi clinice distincte (vezi tabelul 11.6).

Tabelul 11.6. Boli produse prin mutaţii dinamice

Boala	OMIM	Transmitere	Gena	Localizarea genei	Localizarea repetiţiei	Secventa repetiţiei	Repetiţii stabile	Repetiţii instabile
Sindromul X fragil	309550	LX	FMR1	Xq27.3	5'UTR	(CGG)n	6-54	200-1000
Ataxia Friedreich	229300	AR	FRDA	9q13-q21.1	Intron 1	(GAA)n	~7-22	200-1700
Distrofia miotonică	160900	AD	DMPK	19q13	3'UTR	(CTG)n	5-35	50 - 4000
Epilepsia mioclonică	254800	AR	CSTB	21q22.3	Promotor	(CCCCGCCCCGCG)n	~2-3	40-80
Boala Huntington	143100	AD	HD	4p16.3	Exon 1	(CAG)n	~10-26	36-100
Boala Kennedy – Atrofia musculară spinală şi bulbară	313200	XR	AR	Xq11-q12	Exon 1	(CAG)n	9-35	38-62
Atrofia dentatorubrală-palidoluysiană	125370	AD	DRPLA	12p13.31	Regiunea codantă	(CAG)n	3-35	49-88
Ataxia spinocerebelara 1	164400	AD	ATX1	6p23	Regiunea codantă	(CAG)n	6-38	39-83
Ataxia spinocerebelară 2	183090	AD	ATX2	12q24	Regiunea codantă	(CAG)n	14-31	32-77
Boala Machado-Joseph (SCA3)	109150	AD	ATX3	14q32.1	Regiunea codantă	(CAG)n	12-39	62-86
Ataxia spinocerebelară 6	183086	AD	CACNA1A	19p13	Regiunea codantă	(CAG)n	~4-17	21-30
Ataxia spinocerebelară 7	164500	AD	SCA7	3p12-p21.1	Regiunea codantă	(CAG)n	7-35	37-200
Ataxia spinocerebelară 8	603680	AD	SCA8	13q21	Regiunea codantă	(CTG)n	15-21	100-152
Ataxia spinocerebelara 10	603516	AD	SCA10	22q13	Intron 9	(ATTCT)n	~10-22	900-4000
Ataxia spinocerebelară 12	604326	AD	PPP2R2B	5q31-q33	Regiunea codantă	(CAG)n	~9-18	55-78
Ataxia spinocerebelară 17	607136	AD	TBP	6q27	Regiunea codantă	(CAG)n	25-42	50-55

S-a stabilit prin convenţie (1993) că nomenclatura tripletelor repetitive să se facă în direcţia 5'→3'.

1. CARACTERE GENERALE

Mutaţiile dinamice prezintă o serie de proprietăţi comune:

- o creştere *moderată* a numărului repetiţiilor *nu* se asociază deobicei cu apariţia manifestărilor clinice dar determină o creştere a instabilităţii repetiţiei (*premutaţii*);
- *mutaţiile complete* ce produc boala sunt rezultatul unei modificări (de regulă o creştere peste un anumit prag) a numărului repetiţiilor faţă de numărul iniţial;
- există o relaţie relativ liniară între numărul copiilor repetiţiei şi severitatea clinică ori vârsta de apariţie a simptomelor (fenomenul de *anticipaţie*);
- formele cele mai severe se transmit de preferinţă printr-unul dintre părinţi ("*efect parental*");

În capitolul 6.B.1.4. a fost prezentat mecanismul de producere a mutaţiilor dinamice, prin "glisare" sau "derapare" replicativă, determinată de alinierea greşită şi împerecherea decalată a repetiţiilor trinucleotidice. Important de subliniat este faptul că prezenţa unui mecanism unic de producere a mutaţiilor face ca analiza ADN să fie cel mai bun mijloc de diagnostic exact a fiecăreia dintre bolile prin expansiunea unor repetiţii simple. In acest capitol vom discuta consecinţele patogenice pe care aceste mutaţii le au asupra genei afectate şi vom prezenta două exemple ilustrative de boli frecvente produse prin acest mecanism, boală Huntington şi distrofia

miotonică; despre sindromul X fragil vom discuta în capitolul 15.

Mutaţii dinamice se pot asocia cu pierderea funcţiei sau câştig de funcţie

- Creşterea numărului repetiţiilor poate induce alterarea transcripţiei şi, consecutiv, *pierderea funcţiei*. Exemple sunt: *sindromul X fragil* în care expansiunea repetiţiei CGG în regiunea promotor a genei FMR1 conduce la metilarea acestuia; *epilepsia mioclonică* în care expansiunea repetiţiei determină separarea fizică a factorilor de transcripţie în regiunea promotor a genei pentru cistatina B; *ataxia Friedreich* în care expansiunea repetiţiei intronice conduce la apariţia unor conformaţii terţiare ale ADN care interfera transcripţia genei pentru frataxina. Toate aceste cazuri vor prezenta transmitere recesivă, autosomală sau legată de X. Există însă şi cazuri în care reducerea activităţii sau a nivelului unui produs genic realizează un mod de transmitere dominantă, ca urmare a fenomenului de haploinsuficienţă. Acesta pare a fi cazul expansiunii repetiţiei CTG în regiunea promotor a genei SIX5 în cazul *distrofiei miotonice*.
- Mutaţii dinamice cu *câştig de funcţie*.Numeroase expansiuni trinucleotidice sunt localizate în interiorul regiunilor codante ale unor gene şi, ca urmare, vor fi translate în structura proteinei (de exemplu sub forma unor *tracturi poliglutaminice* în cazul repetiţiei CAG). Multe dintre bolile produse prin mutaţii dinamice asociază asemenea tracturi poliglutaminice expansionate, ceea ce a condus la ipoteza că acestea ar putea exercita un efect "toxic" asupra funcţiei proteinelor. Un asemenea efect ar putea fi de exemplu o modificare a structurii tridimensionale a proteinei care conţine tractul poliglutaminic. Există însă şi alte mecanisme care conduc la un câştig de funcţie. De exemplu, expansiunea CAG la nivelul genei CACNA1A (ce codifică un canal de calciu) în ataxia spinocerebeloasă tip 6 conduce la o creştere a capacităţii de transport a calciului de către proteina codificată.

2. BOALĂ HUNTINGTON

Boala (sau coreea) Huntington (OMIM 143100) este o boală neurologică degenerativă, progresivă, caracterizată printr-un sindrom extrapiramidal, însoţit de tulburări psihice care evoluează spre demenţă. Boala se transmite autosomal dominant şi este determinată de mutaţii dinamice ale genei HD pentru *huntingtină*.

Prevalenţa bolii în populaţia europeană este de circa 1 la 20.000 de persoane.

Simptomatologie. Boala este caracterizată prin apariţia în a doua jumatate a vieţii a unor tulburări neurologice motorii (coree, distonie), tulburări cognitive şi de personalitate care evoluează progresiv. In stadiile avansate de boală pacienţii dezvoltă tulburări motorii severe (care îi fac dependenţi), pierdere ponderală, tulburări de somn, incontinenţă şi mutism, iar evoluţia este inexorabila către decesul prematur (vârsta medie la deces fiind 55 de ani).

Genetică. Boala Huntington se transmite autosomal dominant dar are o penetranţă dependentă de vârstă (vezi figura 5.26). Boala este determinată de mutaţii ale genei HD pentru huntingtină care afectează predominant striatumul şi cortexul şi determină manifestările clinice caracteristice. Mutaţiile care cauzează boala Huntington sunt de regulă expansiuni ale unei repeţii CAG localizată la nivelul exonului 1 al genei HD.

- Alelele normale ale genei au 10-26 de repetiţii.
- Alelele cu un număr de 27-35 de repetiţii *nu* determină manifestări clinice dar se asociază cu un risc crescut de expansiune până la mutaţii complete în cursul gametogenezei.
- Alelele mutante ce produc boala au peste 35 de repetiţii; penetranţa unor alele cu 36-41 repetitii este însă redusă.
- Vârsta pacientului la diagnostic este invers corelată cu numărul repetiţiilor CAG; astfel, formele cu debut adult se asociază cu un număr de 40-55 repetiţii, în timp ce debutul juvenil al bolii este asociat unui numar de peste 60 repetitii CAG; nu există însă corelaţii între numărul

repetiţiilor CAG şi alte trăsături ale bolii.

- Transmiterea mutaţiilor în succesiunea generaţiilor se asociază cu un risc de amplificare a numărului repetiţiilor, ceea ce determină fenomenul de *anticipaţie* (apariţia mai precoce a bolii în succesiunea generaţiilor). Acest fenomen de amplificare este mult mai frecvent în gametogeneza masculină. Ca urmare, indivizii care moştenesc o alelă mutantă de la tată au un risc mai mare de a dezvolta forme de boală cu debut juvenil (circa 80% dintre cazurile severe având alela mutantă moştenită de la tată).

Patogenie. Expansiunea repetiţiei CAG conduce la expansiunea tractului poliglutaminic din structura huntingtinei, ceea ce este echivalentul unei mutaţii cu câştig de funcţie. Huntingtina mutantă pare să fie cauza acumulării unor agregate în citoplasma şi nucleii neuronilor de la nivelul neostriatului, cu modificări consecutive ale nivelului receptorilor exprimaţi la acest nivel şi, în final, moartea neuronală. Cu toate acestea, mecanismul exact prin care expansiunea tractului poliglutaminic conduce la producerea bolii nu este bine înţeles.

Tratament. In prezent nu există nici un tratament curativ al bolii. Tratamentul utilizat este unul de suport şi este concentrat asupra ameliorării tulburărilor neurologice şi de comportament.

Sfat genetic şi diagnostic presimptomatic. Intrucât debutul bolii la vârsta adultă, adeseori către sfârşitul perioadei reproductive, este adeseori probabil ca persoanele purtătoare să fi transmis mutaţia la descendenţi. Probabilitatea unui individ de a fi purtător de genă mutantă (heterozigot) dacă este clinic neafectat dar are un părinte afectat se calculează conform teoremei Bayes (vezi capitolul 9.C.4.1.c). Riscul de transmitere a unor mutaţii complete este de 50%. In cazul purtătorilor unor premutaţii riscul de expansiune către o mutaţie completă este de circa 3% în cazul meiozei masculine. In prezent sunt disponibile metode de diagnostic prenatal şi presimptomatic bazate pe analiza numărului repetiţiilor CAG de la nivelul exonului 1 al genei pentru huntingtină. Diagnosticul presimptomatic pune însă numeroase probleme etice având în vedere trauma psihologică pe care o asociază predicţia unei boli pentru care nu există un tratament curativ.

3. **DISTROFIA MIOTONICĂ**

Distrofia miotonică este o afecţiune neuromusculară transmisă autosomal dominant cu o incidenţă de circa 1 la 8000 de nou-nascuti, caracterizată prin penetranţă incompletă şi expresivitate variabilă.

Manifestări clinice. Simptomele apar de regulă la adultul tânăr, primul semn fiind cel mai adesea întârzierea capacităţii de relaxare a mâinii după încleştarea pumnului. Acest semn este denumit *miotonie* şi este prezent în majoritatea cazurilor simptomatice, fiind urmat de hipotonie şi hipotrofie musculară progresive. Alte manifestări frecvente sunt tulburarile de conducere cardiacă, afectarea musculaturii netede, tulburările mentale, hipersomnia, cataracta oculară şi diabetul insulino-dependent. La bărbaţi se adaugă atrofia testiculară şi calviţia frontală precoce. Există şi forme congenitale care se caracterizează prin severitate crescută (hipotonie musculară, retard mental major, displegie facială, dificultăţi de nutriţie şi tulburări respiratorii) şi mortalitate neonatală de până la 25%.

Genetică. Studii de înlănţuire au permis cartografierea genei responsabile de boală pe cromosomul 19q13.2-q13.3, iar în 1992 a fost identificată gena DMPK (ce codifică o protein kinază) şi mutaţia ce produce boala. Distrofia miotonica este inclusă în prezent în categoria bolilor determinate de mutaţii dinamice, afecţiunea fiind asociată cu expansiunea unui triplet CTG în regiunea 3' netranslată a genei. Numărul normal al acestor repetiţii variază între 5 şi 30; formele moderate de boală asociază 50-80 de copii ale tripletului, în timp ce indivizii cu forme severe de boala au peste 2000 de copii. Amplificarea repetiţiei poate avea loc atat în meioza masculină cât şi în cea feminină. Cu toate acestea, expansiunile masive, de ordinul a mii de

repetiţii, apar numai în gametogeneza feminină. Ca urmare, formele congenitale de boală sunt aproape întotdeauna transmise pe cale maternă. Este posibil ca în patogenia bolii să fie implicată şi alterarea funcţiei unor gene vecine DMPK, cum sunt genele SIX5 (care codifică un factor de transcripţie) si RSHL1.

BIBLIOGRAFIE CAPITOL 11

INTERNET

1. Asociaţia naţională pentru boli rare (SUA)- NORD : http://www.NORD~rdb.com/~orphan
2. Baze de date privind
   - bolile colagenului : *http://www.le.ac.uk./genetics/collagen*
   - fibroza chistică : http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/
   - fenilcetonuria : http://www.mcgill.ca/pahdb
3. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : http://geneclinics.org
4. Genecards – bază de date genele umane şi bolile genetice : : http://www.bighost.area.ba.cnr.it/GeneCards –sau http://www.bioinformatics.weizman.ac.il/cards
5. Genetest – bază de date despre teste genetice : http://www.genetest/org
6. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om poate fi accesat prin :
   - site-ul NCBI- USA (Centrul national pentru informaţii în biotehnologie: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
   - site-ul Centrului pentru proiectul de cartografiere a genolului uman din Marea Britanie : http://www.hgmp.mrc.ac.uk/omim
7. Orphanet – bază de date pentru boli genetice : http://orphanet.infobiogen.fr
8. Programul HELIX (sfat şi teste genetice) al Universităţii şi Spitalului de copii din Washington: http://www.healthlinks.washington.edu/helix/
9. Web site al Universităţii din Michigan: http://www.med.umich.edu/
10. Web site-uri de patologie umană:
    - http://www.emedicine.com,
    - http://www.umm.edu/ency/,
    - http://healthcenters.healthanswers.com/library/MedEnc,
    - http://NetDoctor.co.uk,
    - http://www.icondata.com/health/pedbase,
    - http://www.modimes.org/

Bibliografie specifică selectivă

1. Borst P, Elferink RO – *Mammalian ABC transporters in health and disease* – Ann. Rev. Biochem., 2002, 71: 537-592.
2. Bowen DJ – Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights – J. Clin. Pathol., 2002, 55: 1-18.
3. Burrows NP – The molecular genetics of the Ehlers-Danlos syndrome – Clin. Exp. Dermatol., 1999; 24: 99-106.
4. Cederbaum S – *Phenylketonuria: an update* – Curr. Opin. Pediatr., 2002, 14: 702-706.
5. Delaunay J – *Molecular basis of red cell membrane disorders* – Acta Haematol., 2002; 108: 210-218.
6. Gutmann DH – *The neurofibromatosis: when less is more* – Hum. Molec. Genet., 2001;10: 747-755.
7. Hubner CA, Jentsch TJ – *Ion channel diseases* – 2002, 11: 2435-2445.
8. Larkin K, Fardaei M – *Myotonic dystrophy – a multigene disorder* – Brain Res. Bulletin, 2001;56: 389-395.
9. Mannucci PL, Tuddenham EGD – The Hemophilias — From Royal Genes to Gene Therapy –

N.Engl.J.Med, 2001; 344:1773-1779
10. Nishino I, Ozawa E – *Muscular dystrophies* – Curr. Opin. Neurol., 2002, 15: 539-544.
11. Olkkonen VM, Ikonen E – *Genetics defects of intracellular-membrane transport* – N. Engl. J. Med., 2000, 343: 1095-1104.
12. Ostlund C, Worman H – *Nuclear envelope proteins and neuromuscular diseases* – Muscle nerve, 2003, 27: 393-406.
13. Richards RI – *Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease* – Hum. Mol. Genet., 2001, 10: 2187-2194.
14. Ratjen F, Doring G – *Cystic fibrosis* – Lancet, 2003, 361: 681-689.
15. Smith F – *The molecular genetics of keratin disorders* – Am J. Clin. Dermatol., 2003, 4: 347-364.
16. Wu G, Somlo S – *Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease* - Mol.Genet.Metab. 2000;60;1-15

CAPITOLUL 12

BOLILE MITOCONDRIALE

Trăsătura unificatoare a celor peste 120 de fenotipuri patologice atribuite alterării genetice a funcţiei mitocondriilor o constituie *deficitul balanţei energetice*. Scăderea, sub un prag critic, a producţiei de energie la nivel mitocondrial antrenează perturbări majore ale activităţilor celulare, traduse prin declinul capacităţii unor ţesuturi şi organe de a–şi îndeplini funcţiile specifice.

În marea lor majoritate, defectele genetice ale mitocondriilor se manifestă prin deteriorarea funcţiilor sistemului nervos şi ale celui muscular, a căror activitate este dependentă prevalent de energia rezultată din procesul *fosforilării oxidative* (OXPHOS). Patologia mitocondrială nu reprezintă însă apanajul exclusiv al neurologiei. Virtual, *toate organele* pot ajunge în incapacitarea funcţională datorită unor defecte ale mitocondriilor şi, ca atare, multe dintre specialităţile medicale sunt inerent confruntate cu acest tip de patologie, identificat cu numai 13 ani în urmă, şi care se singularizează printr-o serie de caracteristici neobişnuite. Cunoaşterea acestor caracteristici se impune ca o condiţie obligatorie a optimizării diagnosticului şi a evaluării corecte a prognosticului variatelor entităţi morbide în a căror patogenie sunt implicate alterările mutaţionale ale genomului mitocondrial; este demn de subliniat că prevalenţa lor depăşeşte cifra de 1/4000 din indivizi şi acest fapt implică, o dată mai mult, *necesitatea recunoaşterii şi diagnosticării corecte a patologiei mitocondriale*.

A. STRUCTURA MOLECULARĂ, BIOGENEZA ŞI FUNCŢIILE MITOCONDRIILOR

1. GENOMUL MITOCONDRIAL

Celulele umane conţin între 500 şi 2000 de mitocondrii, fiecare din aceste organite având în alcătuirea ei 2-10 molecule circulare de ADN dublu catenar (vezi figura 2.10), fiecare fiind formate din câte 16.569 pb. Excepţiile le constituie eritrocitele, care sunt lipsite de mitocondrii, ovulele nefertilizate şi trombocitele – în ale căror mitocondrii se află doar o singură moleculă de ADN.

1.1. PARTICULARITĂŢILE ADN MITOCONDRIAL

Trăsăturile care diferenţiază ADN mitocondrial (ADNmt) de ADN nuclear (ADNn) au fost prezentate în capitolul 2.C.3. şi sintetizate în tabelul 2.1. Considerăm însă utilă o succintă recapitulare a particularităţilor ADNmt.

- Cele două catene de ADNmt se *deosebesc* prin conţinutul lor în baze azotate şi, implicit, prin densitatea de plutire: una dintre catene este bogată în guanină (lanţul greu, **H**); în mod corespunzător, catena complementară are un conţinut înalt în citozină (lanţul uşor, **L**).
- ADNmt este *lipsit de introni*: exceptând un segment de aproximativ 1000 pb (bucla D – *displacement loop*) în care se află atât originea replicării lanţului greu cât şi promotorii

transcrierii ambelor catene, întreaga secvenţă a ADNmt este copiată în molecule funcţionale de ARN.

- Genele din ADNmt sunt *contigue* sau separate prin doar 1-2 pb.
- Patru dintre cele 64 de „cuvinte" ale codului genetic al ADNmt au o *altă semnificaţie* decât cea a codonilor din genomul nuclear (codoni "eretici" sau "disidenţi").
- Atât în procesul replicării cât şi în cel al transcrierii, ADNmt se comportă ca *o unitate*: o dată iniţiate, cele două procese se desfăşoară fără întrerupere, parcurgând întreaga lungime a moleculei.
- Mitocondriile *nu posedă sisteme eficiente de reparare*[1] a ADN şi, ca atare, erorile inerente replicării, precum şi leziunile produse accidental, rămân în marea lor majoritate necorectate şi se acumulează în genom sub formă de mutaţii; în plus, rata evenimentelor recombinaţionale este foarte redusă.
- ADNmt *nu formează complexe cu histonele* (care au rol protector) şi deaceea ADNmt este deosebit de vulnerabil la acţiunea agenţilor mutageni, dintre care unii – radicalii liberi de oxigen, puternic injurianţi – sunt generaţi în cantităţi mari în chiar matricea mitocondrială, adică în mediul în care se află moleculele de ADNmt.
- ADN polimeraza gamma, enzima replicării ADNmt, operează cu o *fidelitate inferioară* celei a ADN polimerazelor alfa şi delta, acceptând împerecheri greşite sau alunecând peste unul sau mai multe nucleotide.

Ultimele trei trăsături sunt cele care furnizează explicaţia faptului că în ADNmt mutaţiile se produc cu o frecvenţă de 10-20 de ori mai mare decât în ADN nuclear.

1.2. HOMOPLASMIA, HETEROPLASMIA ŞI SEGREGAREA REPLICATIVĂ.

Ca urmare a ratei înalte a mutaţiilor produse în ADNmt, celulele somatice ale unui adult conţin, de regulă, mixturi de mitocondrii – unele cu genom normal şi altele cu genom modificat prin mutaţii. Termenul utilizat pentru a desemna coexistenţa într-o celulă a mitocondriilor genetic normale şi a celor mutante este cel de **heteroplasmie**, iar cel care defineşte prezenţa *exclusivă* a unui tip – normal sau anormal – de mitocondrii este de **homoplasmia**.

În cursul diviziunilor, distribuţia mitocondriilor în celulele fiice se realizează *aleatoriu* (figura 12.1). În succesiunea generaţiilor de celule – somatice sau germinale – raportul dintre numărul mitocondriilor normale şi cel al mitocondriilor mutante este însă supus unor variaţii importante datorate fenomenului derivei genetice. Variaţiile se pot solda cu excluderea totală a uneia dintre subpopulaţii. Procesul prin care se realizează reducerea de la heteroplasmie la homoplasmie se numeşte **segregare replicativă**.

Reducerea la homoplasmie a celulelor somatice necesită un număr mare de diviziuni. În linia germinală feminină segregarea replicativă este însă foarte rapidă: după numai două generaţii, populaţiile mitocondriale ale celulelor germinale se omogenizează.

2. BIOGENEZA ŞI FUNCŢIILE MITOCONDRIILOR

La edificarea unei mitocondrii iau parte produşii proteici ai unui număr de aproximativ 3000 de gene. În marea lor majoritate, aceste gene aparţin genomului nuclear. Sinteza proteinelor codificate de genele nucleare se efectuează pe ribozomii din citosol, de unde sunt transferate în mitocondrii.

[1] În mitocondrii funcţionează câteva dintre mecanismele de reparare a ADN nuclear – BER şi MGMT – dar eficienţa lor este redusă şi rata mutaţiilor care persistă după intervenţia lor este de 10 ori mai mare decât în genomul nuclear (vezi capitolul 6.B.4)

În genomul mitocondrial se afla doar 37 de gene (28 în lanţul greu şi 9 în lanţul uşor), toate participă prin produşii lor la constituirea **lanţului respirator,** format din peste 100 de polipeptide. Genele mitocondriale codifică 22 de tipuri de ARN de transfer, două tipuri de ARN ribozomal şi 13 polipeptide. Moleculele de ARNmt participă la formarea propriului aparat proteinosintetizator iar polipeptidele se constituie în subunităţi din componenţa a 4 din cele 5 complexe enzimatice ale lanţului respirator:

- complexul I (NADH dehidrogenaza) reuneşte peste 40 de polipeptide, dintre care 7 sunt codificate de ADNmt;
- complexul III (ubiquinol:citocrom c oxidoreductaza) are în alcătuirea sa un singur polipeptid mitocondrial (citocromul b);
- complexul IV (citocrom c oxidaza) conţine 3 subunităţi mitocondriale (CoI, CoII, CoIII);
- complexul V (ATP sintetaza) are 13 polipeptide din care două (ATPazele 6 şi 8) sunt specificate de gene mitocondriale.

Ansamblul proteinelor care formează lanţul respirator rezultă, aşadar, prin complementarea a două agregate genice separate spaţial: nucleul şi mitocondriile. Prin urmare, bolile cauzate de defectele lanţul respirator pot fi consecinţa unor mutaţii care afectează:

- genele nucleare sau mitocondriale implicate în sinteza subunităţilor enzimatice individuale ale lanţului respirator; genele nucleare care asigură importul şi asamblarea diferitelor subunităţi ale lanţului respirator;
- genele nucleare care controlează perpetuarea, propagarea şi exprimarea genomului mitocondrial.

Dubla origine – nucleară şi mitocondrială – a componentelor lanţului respirator constituie explicaţia faptului că *transmiterea la descendenţi* a defectelor acestui sistem se poate realiza atât matriliniar (pe linie maternă), cât şi în conformitate cu oricare dintre modurile mendeliene (autosomal dominant, autosomal recesiv, legat de X).

> Genomul mitocondrial este lipsit de secvenţe repetitive, genele care îl alcătuiesc nu au introni, iar procentul de ADN codant este foarte înalt (97% faţă de numai 5% în genomul nuclear). Aceste *similitudini cu genomul procariotelor* justifică aserţiunea că ADNmt provine din cromosomii unor bacterii aerobe endocitate de celule mai mari, total dependente de glicoliza anaerobă pentru producerea cantităţii necesare de molecule macroergice ATP (teoria endosimbiotică). O dată incorporate, bacteriile şi-au pierdut autonomia, multe dintre activităţile lor legate de generarea energiei fiind preluate şi controlate de genomul nuclear, fapt care explică *transmiterea multimodală a defectelor lanţului respirator*.

Întrucât toate cele 37 de gene mitocondriale sunt implicate în procesul fosforilării oxidative (OXPHOS)**,** mitocondriile au fost asimilate unor *centrale energetice celulare.* Funcţiile mitocondriilor nu se limitează însă la generarea de energie. Ele îndeplinesc şi *alte roluri de importanţă majoră* pentru realizarea unor variate activităţi celulare. Printre acestea figurează:

- construcţia şi funcţionarea moleculelor ADN;
- controlul biosintezei pirimidinelor (prin dihidrofolat dehidrogenază);
- sinteza hemului (prin sintetaza acidului delta amino levulinic necesar formării hemoglobinei);
- detoxificarea amoniacului în ciclul ureei;
- metabolizarea colesterolului şi sinteza sexosteroizilor;
- metabolizarea neurotransmiţătorilor;
- producerea şi detoxificarea radicalilor liberi;
- oxidarea grăsimilor, proteinelor şi zaharurilor;
- iniţierea apoptozei.

3. MUTAŢIILE ADNmt

În genomul mitocondrial au fost identificate diferite tipuri de mutaţii: substituţii, deleţii şi inserţii ale unei singure perechi de nucleotide (mutaţii punctiforme), precum şi deleţii, duplicaţii şi rearanjări interesând secvenţe cu lungimi de sute sau mii de nucleotide.

Mecanismele producerii acestor alterări nu diferă de cele prin care sunt generate mutaţiile genomului nuclear. Erorile inerente replicării (împerecheri greşite, derapajele ADN polimerazei gamma, alinierea ilegitimă a catenelor nou sintetizate în raport cu catenele parentale) se fac răspunzătoare de apariţia mutaţiilor denumite **spontane;** leziunile ADN provocate de agenţii din mediul intern sau extern – rămase nereparate – formează categoria mutaţiilor **induse.**

În ceea ce priveşte consecinţele lor, mutaţiile ADNmt, similar celor nucleare, se clasifică în neutre, avantajoase şi detrimentale.

Mutaţiile **neutre** sunt lipsite de consecinţe fenotipice importante şi, ca atare, asupra lor nu se exercită presiunea selecţiei naturale. În marea lor majoritate, mutaţiile neutre rezultă prin substituţii mononucleotidice în poziţia a treia a tripletelor codificatoare (cuvintele de cod) sau în regiunea necodantă (bucla D). Aceste mutaţii generează polimorfismele ADNmt, puternic corelate cu originea etnică şi geografică a populaţiei investigate. Polimorfismele ADNmt sunt intens exploatate în prezent în domeniile paleoantropologiei, criminalisticii şi medicinii legale.

Existenţa mutaţiilor **avantajoase** este susţinută de argumente circumstanţiale. Se consideră că variantele care, realizând o cuplare strânsă a respiraţiei cu fosforilarea oxidativă, reduc producţia de căldură şi o cresc pe cea de ATP, sunt favorabile vieţii la tropice. Invers, mutaţiile care relaxează cuplarea, intensificând astfel termogeneza, ar fi avantajoase în regiunile arctice. Este foarte probabil ca selecţia naturală să fi operat reţinând, atunci când populaţiile au migrat între ecuator şi pol, mutaţiile optime pentru anumite condiţii climaterice şi eliminându-le pe cele inadecvate. Variantele prezumate a conferi avantaj selectiv nu au fost încă identificate.

Mutaţiile **detrimentale** conduc la apariţia unor manifestări clinice a căror severitate diferă în funcţie de *gradul heteroplasmiei, tipul celulelor care le poartă şi gena afectată*.

În cazul mutaţiilor heteroplasmice, relaţia dintre proporţia moleculelor ADN mutante şi declinul producţiei de energie este una directă. Totuşi, efectele fenotipice ale mutaţiilor se fac resimţite numai atunci când eficienţa globală a fosforilării oxidative scade sub un anumit nivel, denumit **prag energetic,** a cărui valoare variază de la un ţesut la altul. Cel mai sensibil la deficitul energetic este sistemul nervos; urmează, în ordine, muşchii scheletici, inima şi rinichiul, glandele endocrine şi ficatul.

Mai puţin evident este însă modul în care alterările diferitelor gene mitocondriale se corelează cu severitatea şi – mai mult decât atât – chiar cu trăsăturile fenotipului patologic pe care îl imprimă. Este un fapt bine stabilit că există mai multe mutaţii care se fac răspunzătoare de apariţia unui acelaşi fenotip şi că o aceeaşi mutaţie poate imprima fenotipuri semnificativ diferite. Această disociere între genotip şi fenotip se explică prin înaltul polimorfism al ADNmt, precum şi prin intervenţia unor factori modificatori epigenetici.

O menţiune specială i se cuvine **depleţiei mitocondriale**. *Depleţia* este termenul utilizat pentru a desemna *reducerea drastică* (uneori cu 98%) a cantităţii de ADNmt. Depleţia se produce, de regulă, într-un singur organ (specificitate de ţesut), căruia îi deteriorează profund şi ireversibil capacitatea funcţională. Literatura conţine exemple de depleţii ale ADNmt din muşchi, rinichi, ficat şi creier. Marea lor majoritate determină tulburări clinice de o gravitate extremă, instalate în primele săptămâni de la naştere şi compatibile cu o supravieţuire de numai câteva luni. Cauzele depleţiei par a fi mutaţiile unor gene autosomale, un exemplu constituindu-l gena factorului de transcriere NRF1. Acest factor reglează transcrierea genelor nucleare care codifică proteinele mitocondriale. Prezenţa depleţiei ADNmt la mai mulţi membri ai unei fratrii, indiferent de sexul lor, precum şi absenţa semnelor la părinţi, indică natura recesivă a mutaţiei cauzatoare.

4.TRANSMITEREA LA DESCENDENŢI A MUTAŢIILOR ADNmt.

Mutaţiile produse în genele mitocondriale se transmit exclusiv pe linie maternă. Exceptând câteva specii de Drosophila şi de rozătoare, spermatozoizii nu contribuie cu citoplasma lor (în care se află un număr de numai 25-30 de mitocondrii) la formarea zigotului. Potrivit unor observaţii recente, celor câteva mitocondrii ale spermatozoizilor pătrunse ocazional în ovul în momentul fertilizării, li se ataşează molecule de ubiquitină care le marchează în vederea distrucţiei. Rezultă că toate cele aproximativ 200.000 de mitocondrii prezente în citoplasma zigotului aparţin ovulului şi, ca atare, celulele viitorului organism vor fi echipate numai cu mitocondrii materne. Consecinţa poate fi exprimată astfel: mamele îşi transmit genotipul mitocondrial copiilor de ambele sexe, dar numai fiicele lor vor fi acelea care îl vor transmite generaţiei următoare (figura 12.2). În cazul în care femeia purtătoare a unei mutaţii mitocondriale are numai descendenţi de sex masculin, mutaţia se va elimina din populaţie deoarece bărbaţii nu pot asigura propagarea ei în succesiunea generaţiilor.

B. PRINCIPALELE TIPURI DE BOLI MITOCONDRIALE

1. MANIFESTĂRILE CLINICE ALE AFECŢIUNILOR MITOCONDRIALE

Principalele elemente care sugerează implicarea alterării funcţiilor mitocondriilor în etiopatogenia unei boli sunt:

- caracterul *necoerent* al asocierii semnelor şi simptomelor clinice;
- debutul cel mai adesea *precoce* şi evoluţia *rapid progresivă*;
- *afectarea concomitentă* a cel puţin trei organe care nu au în comun nici originea embriologică şi nici funcţiile biologice;
- *modificările recurente* survenite în tabloul clinic cu ocazia unor infecţii (ameliorări, agravări);
- prezenţa în tabloul clinic al bolilor comune a unor combinaţii de *trăsături atipice*, inexplicabile.

Perturbările procesului fosforilării oxidative antrenează – virtual – *disfuncţii ale oricărui organ sau ţesut*. Ele pot afecta ţesuturile individual sau în diferite combinaţii. În plus, mutaţii diferite ale ADNmt pot produce manifestări clinice similare, iar o aceeaşi mutaţie poate imprima fenotipuri morbide variate. Studii efectuate pe familii în care s-au decelat mutaţii heteroplasmice ale ADNmt demonstrează că, pe măsura creşterii proporţiei de ADNmt mutant, are loc o *reducere a producţiei de energie*, iar când este atins un anumit *prag*, variabil în funcţie de ţesut, *criza energetică* determină declanşarea manifestărilor patologice. Valoarea pragului depinde de mai mulţi factori: declinul producţiei de energie; creşterea producţiei speciilor reactive de oxigen; iniţierea apoptozei care, depletând ţesuturile, compromite funcţionalitatea acestora. Diferenţa între celulele normale şi cele defective în ce priveşte funcţia mitocondrială este minimă, instalarea bolii producându-se atunci când proporţia de ADNmt mutant atinge 85%.

Semnele de debut pot apărea în orice moment al ontogeniei – din perioada antenatală, până la vârsta adultă – iar spectrul simptomelor de debut ale bolilor mitocondriale este foarte larg (tabelul 12.1).

Tabelul 12.1. Diversitatea simptomelor bolilor mitocondriale şi relaţia cu vârsta de debut.

Organ	Perioada neonatală	Copilărie	Adolescenţă,

	(0- 1 lună)	(o lună-2 ani)	vârsta adultă
SNC	Hipotonie Acidoză lactică Comă acidocetozcă	Retard psihomotor Ataxie cerebeloasă Mioclonie Pseudoaccidente vasculare cerebrale Encefalomiopatie necrozantă subacută	Mioclonie Ataxie cerebeloasă Spasticitate Retard psihomotor Leucodistrofie Atrofie corticală Neuropatie periferică
Musculatura striată	Miopatie Atrofie musculară	Miopatie Atrofie musculară Slăbiciune musculară Hipotonie Mialgie Intoleranţă la efort Mioglobinurii recurente	Miopatie progresivă Slăbiciune musculară Mialgie Intoleranţă la efort Mioglobinurii recurente
Ficat	Insuficienţă hepatică	Hepatomegalie Disfuncţie hepatocelulară	
Inimă	Cardiomiopatie hipertrofică	Cardiomiopatie hipertrofică	Cardiomiopatie concentrică hipertrofică sau dilatativă Bloc cardiac
Rinichi	Tubulopatie proximală (sindromToni-Debre-Fanconi)	Tubulopatie proximală (sindromT DF)	
Aparat digestiv		Vomă, diaree Atrofie a vilozităţilor intestinale Insuficienţă pancreatică exocrină	
Sistem endocrin		Hipostatură Hipoglicemie	Diabet Hipoparartiroidie Hiperaldosteronism
Sistem hematopoietic		Anemie sideroblastică Neutropenie, trombopenie	
Analizatorul auditiv		Surditate neurosenzorială	Surditate neurosenzorială
Analizatorul vizual		Atrofie optică Oftalmoplegie externă progresivă Retinită pigmentară Ptoză palpebrală Cataractă	Oftalmoplegie externă progresivă Ptoză palpebrală Atrofie optică Leber Retinită pigmentară Cataractă
Piele		Pigmentaţie anormală a regiunilor expuse la soare. Păr uscat şi friabil Tricotiodistrofie	

După un interval relativ scurt de timp, semnelor iniţiale li se adaugă – invariabil – cele ale *afectării neuromusculare*. În general, semnele prezente la debut persistă şi se agravează gradual. Uneori însă, ele pot regresa, chiar până la dispariţie, o dată cu dezvoltarea unei simptomatologii care exprimă suferinţa altor organe. Astfel, diareea, pancitopenia sau insuficienţa hepatică se pot remite atunci când în prim-planul manifestărilor clinice se plasează semnele deficitului neuromuscular. De notat că, urmare a acumulării de ADNmt mutant şi a segregării replicative, în fenotipul unui bolnav se pot înregistra variaţii importante, mergând de la înrăutăţirea dramatică a manifestărilor clinice până la completa conversie a afecţiunii Un exemplu îl constituie sindromul Pearson (produs de deleţii ale ADNmt din celulele sanguine), caracterizat prin anemie sideroblastică şi insuficienţă pancreatică exocrină. Bolnavii care supravieţuiesc până în a doua decadă a vieţii dezvoltă adesea sindromul Kearns-

Sayre (produs de acumularea de deleţii ale ADNmt în muşchi şi alte ţesuturi), în ale cărui simptome nu se includ anemia şi deficitul enzimelor pancreatice.

Principalele tipuri de boli mitocondriale, mutaţiile ADNmt care le determină şi codul OMIM la care pot fi obţinute informaţii comlete şi actualizate sunt prezentate în tabelul 12.2

Tabelul 12.2 Boli cauzate de defecte ale funcţiei mitocondriale şi de mutaţii ale ADNmt.

Boala	Mutaţii	OMIM#
Oftalmoplegia externă cronică progresivă (CPEO) Sindromul Kearns-Sayre (KSS) Miopatii oculare Cardiomiopatii ereditare	Deleţii Deleţii Rearanjări	555000 530000
Miopatie, encefalomiopatie, acidoză lactică, accidente cerebrale vasculare (*myopathy, encephalomipathy, lactic acidosis, stroke* – MELAS)	ARNt ^{leu}A→G 3243	540000
Epilepsia mioclonică cu fibre musculare roşii în lambouri (*Myoclonic epilepsy and ragged red fibers* – MERFF)	ARNt ^{lys}A→G 8344	545000
Boala Leigh şi slăbiciunea musculară neurogenică, ataxia şi retinita pigmentară (*neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa* - NARP)	T→G 8993; T→C 8993	516060
Neuropatia optică ereditară Leber (*Leber hereditary optic neuropthy* – LHON)	Multiple	535000 516000
Ototoxicitatea aminoglicozidică (*aminoglycoside ototoxicity*)	A→G 1555	580000
Encefalomiopatia progresivă	Δ^{β}271	590050/60
Boala Alzheimer cu debut tardiv, boala Parkinson	ARNt ^{glu}A→G 4336	502500

Se acceptă că există cinci categorii majore de afecţiuni, definite molecular, determinate de mutaţii ale ADNmt (**citopatii mitocondriale**).

- **Oftalmoplegia externă cronică progresivă (CPEO) şi sindromul Kearns-Sayre (KSS).**
  - **CPEO** se caracterizează prin ptoză palpebrală, oftalmoplegie, tulburări miopatice la nivelul musculaturii membrelor. La examenul histologic al fragmentelor de muşchi scheletici recoltate prin biopsie se observă aspectul care defineşte cele mai multe dintre encefalomiopatiile mitocondriale: fibre musculare roşii în lambouri. Acest aspect este creat prin proliferarea anormală a mitocondriilor, consecutivă defectelor biochimice severe ale fosforilării oxidative.
  - **Sindromul Kearns-Sayre (KSS)** se caracterizează prin hipostatură, întârzierea dezvoltării pubertare, oftalmoplegie externă, ptoză palpebrală, semne de hiperparatiroidie, surditate, ataxie cerebeloasă, blocuri cardiace şi retinopatie pigmentară atipică. Afecţiunea debutează înaintea vârstei de 20 de ani. Ambele sindroame sunt consecinţa unei deleţii unice mari (8 kb) a ADNmt.
- **Sindromul MELAS** (*Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic acidosis, Stroke-like episodes*) este o boală multisistemică în care, pe lângă semnele cardinale desemnate prin acronimul MELAS există o amplă varietate de anomalii clinice, dintre care cele mai frecvente sunt: hipostatura, surditatea, convulsiile generalizate, episoadele de vomă. Consecutiv ictusurilor cerebrale se instalează hemiplegii, hemianopsii, amauroză centrală. La peste 80% dintre pacienţi se detectează mutaţii punctiforme în gena ARNt$^{Leu(UUR)}$ în poziţiile nucletidice 3243 şi 3271.
- **Epilepsia mioclonică cu fibre musculare roşii în lambouri (***myoclonic epilepsy with ragged-red fibers* – **MERFF**) se defineşte prin mioclonie intensă, ataxie progresivă, slăbiciune musculară, crize de convulsii generalizate, surditate, demenţă, acidoză lactică, ictusuri cerebrale recurente. Mutaţia care determină MERFF este o tranziţie A→G la situsurile 8344 sau 8356 din gena pentru ARNt^{LYS}.

- **Neuropatie, ataxie, retinită pigmentară (NARP)/ boala Leigh cu transmitere maternă.** Sindromul **NARP** include: întârziere a creşterii postnatale, detresă respiratorie cu crize de apnee, slăbiciune la nivelul muşchilor proximali ai membrelor, neuropatii senzoriale cu amauroză şi surditate, ataxie, convulsii, retinită pigmentară. La bolnavii cu **NARP** se detectează o mutaţie punctiformă în poziţia 8993 a genei care codifică subunitatea 6 a ATP sintetazei. Când proporţia celulelor mutante este foarte înaltă, se constituie fenotipul encefalopatiei necrozante subacute, cunoscută sub numele de **boala Leigh**
- **Neuropatia optică ereditară Leber (LHON).** Boala debutează dramatic prin semne de nevrită retrobulbară acută sau subacută nedureroasă. Pierderea vederii se instalează brusc şi este, în 50% din cazuri, unilaterală; afectarea celuilalt ochi este însă obligatorie şi se produce în interval de aproximativ o lună. 70% dintre bolnavi sunt bărbaţi, ceea ce a condus la ipoteza, neconfirmată însă, a intervenţiei adiţionale a unei gene de pe cromozomul X. Vârsta medie de debut este de 23 de ani. Aspectul de papilită este prezent de la începutul bolii; atrofia optică nu reprezintă, totuşi, niciodată un semn precoce; dezvoltarea ei este progresivă şi devine completă doar la două treimi dintre bolnavi. În unele cazuri, tabloul clinic include, pe lângă manifestările oftalmologice, diferite alte tulburări: neuropatii periferice, distonie, mielopatie demielinizantă, defecte de conducere cardiacă. Mutaţiile 3460 şi 11778 (de la nivelul genelor ND1 şi ND4 imprimă un caracter de gravitate, în timp ce forma indusă de mutaţia 14484 este mai blândă, compatibilă chiar cu redobândirea parţială a vederii.

Tabelul 12.3 prezintă sinoptic trăsăturile clinice ale celor mai frecvente sindroame clinice produse de mutaţiile ADNmt iar în tabelul 12.4 simptomele prezente în diferite citopatii mitocondriale sunt grupate pe organe şi sisteme.

Tabelul 12.3. Boli mitocondriale mai frecvent întâlnite.

Boala	Trăsături clinice	Trăsături adiţionale
Oftalmoplegia externă cronică progresivă	Oftalmoplegie externă Ptoză bilaterală	Miopatie proximală moderată
Sindromul Kearns Sayre	Debut prin oftalmoplegie externă progresivă înaintea vârstei de 20 de ani Retinită pigmentară Ataxie cerebeloasă, blocuri cardiace	Surditate bilaterală Miopatie Disfagie Diabet zaharat,Hipoparatiroidism Demenţă
MELAS	Ictusuri cerebrale înaintea vârstei de 40 de ani Convulsii şi/sau demenţă Fibre musculare roşii în lambouri şi/sau acidoză lactică	Diabet zaharat Cardiomiopatie (iniţial hipertrofică, ulterior dilatativă) Surditate bilaterală Retinopatie pigmentară Ataxie cerebeloasă
Epilepsie mioclonică cu fibre musculare roşii în lambouri (MERF)	Mioclonii Convulsii Ataxie cerebeloasă Miopatie	Demenţă Atrofie optică, surditate bilaterală Neuropatie periferică, spasticitate Lipoame multiple
Neuropatia optică ereditară Leber (LHON)	Pierderea bilaterală a vederii, nevrită retrobulbară nedureroasă Raportul bărbaţi:femei – 4:1 Vârsta medie de debut –23 de ani	Distonie Sindroame de preexcitare cardiacă
Neuropatie, ataxie şi retinită pigmentară (NARP)	Neuropatie periferc cu debut în adolescenţă sau la adult Ataxie Retinopatie pigmentară	Calcificări ale ganglionilor bazali Electroretinogramă anormală Neuropatie sesorimotorie
Sindromul Leigh	Encefalopatie subacută Semne ale afectării cerebelului şi ale trunchiului cerebral	Calcificări în ganglionii bazali Istoric matern de afecţiuni neurologice sau de sindrom

		Leigh
Miopatia infantilă şi acidoza lactică (forme letale şi neletale)	Hipotonie în primul an de viaţă Dificultăţi în alimentaţie şi respiraţie	Forma fatală poate fi asociată cu cardiomiopatie şi/sau cu sindrom Toni-Debre-Fanconi
Sindromul Pearson	Anemie sideroblastică Pancitopenie Insuficienţă pancreatică exocrină	Defecte tubulare renale

Tabelul 4. Tulburări asociate cu citopatiile mitocondriale.

Organ/sistem	Simptome asociate
Creier	Întârzieri ale dezvoltării, retard mental, tulburări neuropsihice, demenţă, crize comiţiale, mioclonii, tulburări ale motilităţii (distonie, diskinezie, coree), paralizie cerebrală atipică, migrene, ictusuri cerebrale.
Nervi	Slăbiciune, durere neuropatică, absenţa reflexelor, probleme gastrointestinale (reflux gastroesofagian, golire gastrică întârziată, constipaţie, pseudo-obstrucţie), lipotimii, transpiraţie absentă sau excesivă cu afectare a termoreglării.
Muşchi scheletici, Muşchi oculari extrinseci	Slăbiciune, hipotonie, crampe, dureri musculare Ptoză, strabism dobândit, oftalmoplegie
Rinichi	Tubulopatie proximală cu pierderi de proteine, magneziu, fosfor, calciu etc
Inimă	Defecte de conducere (blocuri), cardiomiopatii
Ficat	Hipoglicemie, insuficienţă hepatică
Analizator vizual	Reducerea sau pierderea vederii (retinită pigmentară, atrofie optică)
Analizato auditiv	Deficit al auzului, surditate
Pancreas	Diabet şi insuficienţa secreţiei exocrine
Sistemice	Falimentul creşterii, hipostatură, oboseală, probleme respiratorii

Unele dintre trăsăturile fenotipice imprimate de diferitele mutaţii ale ADNmt sunt comune mai multor entităţi nosologice incluse în categoria citopatiilor mitocondriale. Suprapunerea semnelor clinice este redată în tabelul 12.5, iar în tabelul 12.6 sunt prezentate manifestările sistemice ale citopatiilor mitocondriale.

Tabelul 12.5. Trăsături clinice asociate cu citopatiile mitocondriale.

Trăsătura clinică	CPEO/ KSS	MELAS	MERRF	NARP	LHON
Oftalmoplegie	+	±	–	–	–
Degenerarea retiniană	+	–	–	–	–
Retinita pigmentară	–	–	–	+	–
Atrofia optică	–	–	–	–	+
Blocuri cardiace	+	–	–	–	–
Mioclonii	–	–	+	+	–
Ataxia	+	–	+	+	–
Slăbiciune	+	+	+	+	–
Crize comiţiale	–	+	+	+	–
Demenţă	+	+	+	+	–
Hipostatură	+	+	+	–	–
Episoade de vomă	–	+	–	–	–
Cecitate corticală	–	+	–	–	–
Hemipareză, hemianopsie	–	+	–	–	–
Surditate sensorineurală	+	+	–	+	–
Neuropatie	±	±	±	+	–
Acidoză lactică	+	+	+	±	–
Fibre musculare roşii în lambouri	+	+	+	–	–
Istoric familial pozitiv	–	+	+	+	+

Tabelul 12.6. Manifestări sistemice ale bolilor mitocondriale.

Metabolice	Acidoza lactică, coma cetoacidozică
Hepatice	Hepatopatie, insuficienţă funcţională
Cardiace	Cardiomiopatie, defecte de conducere
Renale	Tubulopatii proximale şi distale, glomerulopatii
Intestinale	Diaree, atrofie viloasă, sindrom pseudoobstructiv
Pancreatice	Disfuncţie a acinilor
Endocrine	Hipertiroidie, diabet zaharat, hipostatură
Oftalmologice	Cataractă, retinopatie pigmentară

Cel mai adesea, manifestările clinice iniţiale ale citopatiilor mitocondriale exprimă suferinţa unui singur organ. Nici una dintre manifestările de debut nu este de natură să orienteze asupra implicării în patogenia bolii a unui defect mitocondrial. Asocierea ulterioară a semnelor afectării altor aparate şi sisteme impune efectuarea unor *examene paraclinice* ale căror rezultate pot documenta posibila disfuncţie mitocondrială (vezi tabelul 12.7).*Testul decisiv de diagnostic îl constituie însă analiza moleculară a ADNmt*.

Tabelul 12.7. Rezultate posibile ale explorărilor paraclinice în citopatiile mitocondriale.

Histologie	Fibre musculare roşii în lambouri
Histochimie	Proliferarea excesivă a mitocondriilor şi deficienţele citocrom c oxidazei
Microscopie electronică	Anomalii morfologice ale mitocondriilor
Electromiografie	Potenţiale miopatice
Audiogramă	Surditate senzorială
Electrocardiogramă	Defecte de conducere
Biochimie	Raport molar lactat/piruvat crescut (>20) în ser şi în LCR; hiperlactatemie > 3mm/l sau > 1,5mm/l în LCR ; acidoză metabolică (bicarbonaţi plasmatici crescuţi). Polarografia permite stabilirea consumului de oxigen. Hiperglicemia indică prezenţa unui diabet asociat.
Neuroimagistică (TC,RMN)	Calcificări în ganglionii bazali, atrofie difuză şi/sau focală a cortexului şi cerebelului
Analiza ADNn şi ADNmt	Mutaţii, deleţii, duplicaţii în celulele sanguine sau din fibrele muşchilor scheletici. Pot fi evidenţiate mutaţii în genomul nuclear sau în cel mitocondrial

2. TRATAMENTUL BOLILOR MITOCONDRIALE

Tratamentele convenţionale conduc uneori la ameliorarea temporară a simptomatologiei clinice a bolilor mitocondriale şi la restaurarea, cel puţin parţială, a parametrilor biochimici alteraţi. Aceste tratamente comportă administrarea agenţilor antioxidanţi (ascorbat, alfa-tocoferol, menadionă, glutation, acid lipoic, seleniu), a unor cofactori ai enzimelor lanţului respirator (riboflavina), a vitaminelor complexului B (tiamină, niacină, B6, B12, biotină, acid pantotenic), a L-carnitinei (o substanţă alimentară necesară transportului acizilor graşi prin membranele mitocondriale) şi a coenzimei Q10, aceasta din urmă participând la generarea de energie şi acţionând ca antioxidant cu rol de protecţie a celulelor împotriva injuriei produse de speciile reactive de oxigen. Trebuie specificat că tratamentele convenţionale nu reuşesc să stabilizeze boala şi, cu atât mai puţin, să o vindece. La unii pacienţi severitatea simptomelor poate să decline iar progresia bolii poate fi întârziată. Se impune însă ca tratamentul să fie condus de un specialist în boli metabolice deoarece administrarea fără prescripţie a medicaţiei se poate solda cu întârzierea sau eşecul stabilirii unui diagnostic corect.

Elaborarea unor strategii alternative reprezintă o cerinţă obligatorie; aceste strategii nu pot fi altele decât cele ale terapiei genice.

Până în prezent au fost imaginate trei abordări diferite care vizează suplinirea sau corectarea prin metodele geneticii moleculare a defectelor structurale ale ADNmt:

- înlocuirea genelor mitocondriale mutante cu gene normale inserate în genomul nuclear. Procedura presupune convertirea prin mutageneză dirijată a codonilor eretici în cuvinte ale codului universal. Gena este apoi amplasată într-un vector şi transfectată prin intermediul acestuia în genomul nuclear. Produsul proteic sintetizat în citoplasă este cuplat cu o secvenţă de sortare care îl introduce în mitocondrii unde va funcţiona compensând deficitul creat de mutaţia patologică;
- introducerea în mitocondrii a unei proteine cuplate cu secvenţa de ADNmt care codifică lanţuri polipeptidice sau molecule de ARNt şi ARNr. Importul în mitocondrii este asigurat prin ataşarea semnalului de sortare. Prin această tehnică s-a reuşit transferul în mitocondrii al unor segmente de ADN cu lungimi cuprinse între 0,3 şi 3 Kb;
- eliminarea moleculelor ADNmt mutante prin blocarea specifică a replicării: se utilizează oligonucleotide antisens care, fixându-se pe secvenţa alterată, fac imposibilă replicarea moleculei în care se află mutaţia, fără a afecta replicarea moleculelor normale.

În laboratoarele de cercetare aceste strategii şi-au dovedit eficienţa. Introducerea lor în practică este însă condiţionată de rezolvarea multiplelor probleme de ordin tehnic cu care se confruntă, în general, terapia genică.

C. MUTAŢIILE ADNmt ŞI SENESCENŢA

Capacitatea generării ATP prin procesele fosforilării oxidative declină în paralel cu înaintarea în vârstă. Deficitul de ATP este evident în toate ţesuturile senescente alcătuite din celule diferenţiate terminal (postmitotice). Declinul producţiei de ATP se corelează atât cu instalarea şi progresiunea semnelor senescenţei, cât şi cu acumularea de alterări mutaţionale ale ADNmt.

În celulele sistemului nervos central ale indivizilor vârstnici a fost decelată o deleţie de 5 Kb. Cea mai înaltă proporţie de molecule ADNmt deletate se înregistreaază în substanţa neagră, nucleul caudat şi putamen. La vârsta de 85 de ani această mutaţie este detectată în peste 10% din neuronii nucleilor bazali; ea afectează şi alte zone ale encefalului, dar lipseşte din neuronii cerebelului. În fibrele muşchilor scheletici, pe lângă deleţia de 5 Kb, la persoanele vârstnice se decelează şi o deleţie de 3 Kb. După vârsta de 35 de ani, în fibrele miocardice încep să se acumuleze mutaţii reprezentate cu precădere de deleţia unui segment cu o lungime de 3,6 Kb.

Incriminate în producerea mutaţiilor ADNmt sunt speciile reactive de oxigen. Nivelul crescut al 8-hidroxiguanozinei în ADNmt este consecinţa stresului oxidativ la care este expus permanent genomul mitocondriilor. Proporţia de 100-300 ori mai înaltă a moleculelor cu deleţii în ganglionii bazali ai bătrânilor se explică prin faptul că aceste formaţiuni sunt foarte bogate în fibre dopaminergice; dezaminarea oxidativă a dopaminei de către monoaminooxidază produce o mare cantitate de radicali liberi. În boala coronariană, alternanţa ischemie-reperfuzie stimulează producerea speciilor reactive de oxigen.

Prin intermediul mutaţiilor pe care le determină, radicalii liberi se constituie în cauza majoră a deteriorării progresive a mecanismelor mitocondriale implicate în metabolismul energetic. Acumularea în exces a mutaţiilor mitocondriale şi dezechilibrul subsecvent între necesarul de energie al celulelor şi posibilitatea asigurării acestuia se află la originea bolilor degenerative ale vârstei a treia.

D. MUTAŢIILE ADNmt ÎN BOLILE DEGENERATIVE

În neuronii dopaminergici din regiunea nigrostriat şi din muşchii scheletici ai pacienţilor cu boala Parkinson au fost identificate deficienţe ale complexului I şi leziuni oxidative, prezente şi în cibrizii realizaţi din celulele patologice. **Cibrizii** sunt celule himerice, formate prin fuzionare. Nucleii acestor celule provin de la indivizi aparent sănătoşi, iar citoplasma – de la bolnavi cu afecţiuni mitocondriale. Raportul ADNmt mutant/ADNmt normal este, în medie, de 10 ori mai înalt la bolnavi comparativ cu martorii sănătoşi. Răspunzătoare de perturbarea metabolismului energetic este considerată a fi deleţia de 5 Kb a ADNmt, evidenţiabilă mai ales în neuronii nucleilor bazali.

Scleroza laterală amiotrofică este consecinţa degenerării motoneuronilor somatici din trunchiul cerebral şi măduva spinării. Aproximativ 10% dintre bolnavi sunt purtători ai unor mutaţii autosomal dominante cu penetranţă înaltă, exprimate după vârsta de 60 de ani. Mutaţiile interesează gena nucleară codificatoare a uneia dintre formele superoxid dismutazei. În lipsa SOD, anionul superoxid rămâne activ perioade mai lungi de timp şi îşi exercită efectul toxic asupra ADNmt, provocându-i leziuni ce se vor traduce prin deficit energetic.

În boala Alzheimer mutaţiile ADNmt sunt detectabile în neuronii cortexului cerebral în care se înregistrează şi reduceri importante ale activităţii piruvat dehidrogenazei şi a complexului I. Aceste observaţii certifică participarea la patogenia bolii a perturbării mecanismelor mitocondriale ale generării de energie.

Un alt ţesut ale cărui funcţii sunt frecvent alterate ca urmare a acumulării defectelor mitocondriale este miocardul. În fibrele musculare cardiace ale bolnavilor cu cardiomiopatie dilatativă analizele moleculare relevă prezenţa moleculelor ADNmt cu deleţii de dimensiuni variate. Majoritatea cazurilor de cardiomiopatie dilatativă sunt familiale. S-a sugerat că de producerea deleţiilor multiple ale ADNmt se face răspunzătoare mutaţia unei gene nucleare cu rol în menţinerea integrităţii genomului mitocondrial.

Diabetul zaharat insulino-independent (DZII) se dezvoltă la vârste avansate şi manifestă trăsăturile unei boli degenerative. La unii dintre bolnavii cu DZII au fost detectate mutaţii ale ADNmt în celulele insulelor Langerhans şi în fibrele musculare scheletice. S-a demonstrat că agenţii diabetogeni – interleukina β, interferonul γ , factorul de necroză tumorală tip alfa, aloxanul, streptozotocina – acţionează asupra mitocondriilor din celulele β insulare, stimulând producerea speciilor reactive de oxigen sau determinând alchilarea ADN. Rupturile induse prin aceste mecanisme în moleculele ADNmt antrenează moartea celulelor beta, urmată de instalarea insuficienţei de insulină.

La bolnavii cu sindrom Kearns-Sayre şi la cei cu oftalmoplegie externă cronică progresivă incidenţa diabetului zaharat este de câteva ori mai înaltă decât în populaţia generală, iar sindromul MELAS se asociază uneori cu DZII. Rezultă, aşadar, că celulele β insulare, mari consumatoare de energie, se situează printre elementele cele mai afectate de prezenţa mutaţiilor constitutive sau dobândite ale ADNmt.

E. MUTAŢIILE MITOCONDRIALE ŞI TUMORIGENEZA

Există un consens în a se considera că ADNmt este implicat în tumorigeneză datorită atât vulnerabilităţii sale la stresul oxidativ, cât şi mutabilităţii înalte pe care o manifestă. Speciilor reactive de oxigen li se atribuie roluri în iniţierea şi în promovarea cancerului, precum şi în reducerea producţiei de ATP mitocondrial. Aberaţii mitocondriale au fost notate în majoritatea tumorilor maligne (cancere de vezică urinară, sân, colon, rinichi, ficat, plămân, stomac, ale capului şi gâtului, limfoame şi leucemii). Mutaţiile ADNmt detectate în cancere sunt similare celor răspunzătoare de producerea bolilor mitocondriale, Recent s-a raportat prezenţa a 12 mutaţii somatice homoplasmice în şapte din zece linii celulare stabilite din tumori colorectale. De altfel, în cele mai multe cancere mutaţiile sunt homoplasmice, ceea ce sugerează că fixarea anumitor alterări ale ADNmt poate dota celulele maligne cu avantaj

selectiv. Creşterea cantităţii de transcripte ale ADNmt, precum şi creşterea expresiei subunităţilor codificate de ADNmt din alcătuirea complexelor LR sunt interpretate ca reflectând răspunsul mitocondrilor la cerinţele înalte de energie ale celulelor canceroase. Este cunoscut că celulele maligne au, de regulă, o capacitate considerabil mai mare decât cea a corespondentelor lor normale de a realiza glicoliza aerobă, fapt ce justifică aserţiunea că o importanţă crucială în procesul tumorigenezei ar avea-o existenţa unei forme de interacţiune mitocondrie-celulă, încă neprecizată.

BIBLIOGRAFIE CAPITOL 13

INTERNET

1. Bază de date privind bolile genomului mitocondrial uman : http://www.gen.emory.edu/mitomap.html
2. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : (http://geneclinics.org)
3. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omin/
4. Programul HELIX (sfat şi teste genetice) al Universităţii şi Spitalului de copii din Washington: http://www.healthlinks.washington.edu/helix/
5. Web site MedlinePlus web pentru boala coronariană: http://www.nlm.nih.gov/
6. Web site al universităţii din Michigan: http://www.med.umich.edu/

Bibliografie specifică selectivă

1. Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B et al. − *Late-onset optic atrophy, ataxia and myopathy associated with a mutation of a complex II gene* −Ann Neurol 2000;48:330-335.
2. Chinnery PF, Andrews RM, Turnbull DM, Howell N. − *Leber`s hereditary optic neuropathy: does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation* − Am J Med Genet 2001;98:235-43.
3. Chinnery PF, Turnbull DM. − *The epidemiology and treatment of mitochondrial disease.* Am J Med Genet 2001;106:94-101.
4. Darin N, Oldfords A, Moslemi AR et al. − *The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical and DNA abnormalities.* Ann Neurol 2001;49:376-83.
5. DiMauro S, Schon EA. − *Mitochondrial DNA mutations in human disease* − Am J Med Genet 2001;106:18-27.
6. Johns DR - *Mitochondrial DNA and disease*- N.Engl.J.Med 1995;333:638-644
7. Leonard JV, Schapira AVH. − *Mitochondrial respiratorz chain disorders I: mitochondrial DNA defects.* − Lancet 2000;355:299-304.
8. Munnich A, Rustin P. − *Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders* − Am J Med Gen 2001;106:4-17.
9. Stefanescu DT, Calin GA, Stefanescu F. − *Genetică Medicală – Progrese Recente.* Editura Tehnică, 1998
10. Suomalainen A, Kaukonen J, Amati P et al. − *An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrialDNA.* − Nat Genet 1995;9:146-51

CAPITOLUL 13

BOLILE MULTIFACTORIALE

Mulţi medici consideră că domeniul geneticii clinice este rezervat specialiştilor care se ocupă de boli rare, monogenice sau cromosomice. Acest concept este însă profund greşit şi tinde să se schimbe rapid deoarece, spre exemplu, în anul 2000, în nouă din primele 10 cauze de mortalitate, printre care bolile cardiace şi cancerul, au fost identificate componente genetice importante. Toate aceste afecţiuni sunt considerate astăzi ca fiind boli multifactoriale.

Bolile multifactoriale sunt determinate de interacţiunea complexă dintre factorii genetici şi diferiţi factori din mediu care declanşează, accelerează sau exacerbează procesul patologic. Aceste afecţiuni sunt comune (frecvente) la copil şi adult, interesând mai mult de 5% din populaţie, şi determină o proporţie importantă din morbidiatatea şi mortalitatea generală.

Contribuţia factorilor genetici în producerea acestor boli a fost demonstrată de agregarea familială, studiile efectuate pe gemeni, studiile de adopţie sau asocierea cu anumiţi markeri genetici (vezi capitolul 5.E); mai mult, această contribuţie a fost şi cuantificată prin determinarea *heritabilităţii*, ce exprimă proporţia factorilor genetici în etiologia bolii (vezi tabelul 5.16). Şi totuşi, nu se este cunoscut încă numărul genelor implicate în producerea bolii, natura lor şi mai ales modul în care un anumit genotip prin combinaţie cu anumiţi factori de risc din mediu determină boala. Se consideră că factorii genetici determină o *predispoziţie genetică* la boală care va duce la îmbolnăvire numai dacă asupra individului vulnerabil acţionează anumiţi factori nocivi din mediu. S-au elaborat diferite modele teoretice explicative (de exemplu, modelul susceptibilităţii cu prag, descrise în secţiunea 5.E.4.2) precum şi reguli privind calcularea riscului empiric de recurenţă în familie (vezi capitolul 9.C.5).

Numai aplicarea unor tehnici de analiză moleculară a polimorfismelor genice combinată cu noi strategii de epidemiologie genetică va permite, foarte probabil, identificarea genelor sau mai exact a variantelor alelice implicate în bolile multifactoriale, înţelegerea etiopatogeniei lor, evaluarea corectă a riscului şi mai ales stabilirea unor mijloace adecvate de prevenţie.

> Reamintim că o genă poate prezenta mai multe variante alelice care atunci când depăşesc o frecvenţă populaţională de 1% realizează un polimorfism genic. Studiul polimorfismelor este important deoarece anumite alele se corelează cu un risc crescut pentru o anumită boală (vezi capitolul 6.D). Printre polimorfismele genetice aproximativ 90% sunt reprezentate de polimorfismele mononucleotidice – SNPs (de la single nucleotide polymorphism; se pronunţă „snips") – cu o distribuţie de circa 1 per 1000 pb şi localizate inclusiv în regiunile codante (exoni) şi reglatoare; de aceea, se crede că ele pot fi implicate în procesul de boală. În felul acesta SNPs reprezintă o nouă generaţie de markeri genetici utilă pentru identificarea locilor asociaţi cu boli comune ale adultului precum şi cu răspunsul la medicamente

Cert este că acest domeniu va fi intens cercetat în viitor datorită frecvenţei şi consecinţelor medicale importante ale bolilor multifactoriale.

Bolie multifactoriale cuprind două mari categorii de afecţiuni: bolile comune ale adultului (boala coronariană, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, astmul bronşic, ulcerul peptic, schizofrenia, obezitatea, cancerul ş.a) – cu o prevalenţă de 1-5% – şi malformaţiile congenitale izolate la copil (defectele de tub neural, despicăturile labiale şi/sau palatine, malformaţiile congenitale de cord, stenoza pilorică, piciorul strâmb congenital, luxaţia congenitală de şold ş.a) – cu o incidenţă de 1-8‰ de nou născuţi. Vom preciza că unele dintre aceste entităţi (cu etiologie heterogenă) pot include şi forme monogenice, cu transmitere

mendeliană, mai mult sau mai puţin rare. Astfel circa 5% din cazurile de boală coronariană, sunt produse de hipercolesterolemia familială (AD) iar circa 5% din cazurile de cancer de sân, apar la femei purtatoare ale unor mutatii germinale ale genelor BRCA1 sau BRCA2 (AD). Deci un set de bolnavi cu boli comune vor avea un determinism monogenic şi riscuri de recurenţă mult mai mari decât cele calculate empiric. Acest lucru este foarte important de reţinut pentru practica sfatului genetic.

A. BOLILE COMUNE ALE ADULTULUI

1. BOALA CORONARIANĂ.

Boala coronariană reprezintă una din principalele cauze de morbiditate (3%) şi mortalitate în ţările dezvoltate, fiind expresia leziunilor aterosclerotice de la nivelul arterelor coronare.

Aceste leziuni încep să se producă foarte precoce în cursul vieţii prin acumularea de lipoproteine în intima arterelor coronare şi evoluează formând o placă de aterom ce conţine ţesut fibros, fibre musculare netede şi lipide; aceasta îngustează lumenul arterelor coronare, reducând fluxul sanguin; uneori placa de aterom se poate rupe producând obstrucţia vasului (infarct miocardic acut)

Riscul de producere a bolii coronariene este crescut de către o serie de factori de mediu: grăsimile din alimentaţie, fumatul, consumul de alcool şi inactivitatea, precum şi de o serie de boli ca hipertensiunea, diabetul zaharat, hiperlipidemiile. Numeroase studii efectuate în ultimele 3-4 decenii au arătat însă că factorii genetici au o contribuţie importantă în etiologia bolii. Astfel agregarea familială este crescută iar concordanţa bolii la gemenii MZ este semnificativ mai mare decât la gemenii DZ. Rudele de gradul întâi ale bolnavilor au un risc de 5-7 ori mai mare de a face boală coronariană[1] comparativ cu populaţia generală.

Un element care pledează pentru ereditatea multifactorială a bolii coronariene îl reprezintă faptul că bărbaţii sunt mai frecvent afecataţi şi fac forme mai grave (decesele prin IMA sunt mai frecvente); rudele de gradul întâi ale unei femei bolnave (sexul mai rar afectat) au un risc mai mare de boală coronariană comparativ cu rudele bărbaţilor bolnavi.

Pornind de la aceste constatări s-au cercetat genele[2] şi produşii lor proteici care ar putea influenţa dezvoltarea şi progresia aterosclerozei coronariene. În această categorie se includ gene ce codifică proteine implicate în transpotul şi metabolismul lipidelor[3], sistemul renină-angiotensină, citokinele şi moleculele de adeziune, sistemul de coagulare şi fibrinoliză iar, mai recent, genele implicate în producerea oxidului nitric, în metabolismul homocisteinei şi în inflamaţie (tabelul 11.2). Deşi rolul multor polimorfisme nu a fost încă unanim confirmat, genele implicate în metabolismul lipidelor, cum ar fi apolipoproteina E (APOE) sau unele variante ale genei pentru receptorul LDL au un rol cauzal atât asupra nivelului plasmatic al LDL-colesterolului cât şi asupra fenotipului clinic al bolii coronariene. De asemenea, varianta B2/B2 a genei pentru proteina de transfer a esterilor de colesterol (CETP) se asociază cu un nivel crescut al HDL-C care protejează persoana de boală coronariană. S-a mai stabilit că indivizii cu alela D (genotip DD sau DI) a genei pentru enzima de conversie a angiotensinei (ACE) au o activitate ACE mai mare şi un prognostic mai rău. Au fost evidenţiate şi o serie de polimorfisme genetice care ar putea avea efect protectiv împotriva dezvoltării bolii coronariene, precum alelele mai rare ale polimorfismelor T715P la nivelul selectinei P sau V34L la nivelul factorului XIII al coagulării (alela cu prolină în cazul selectinei P şi alela cu leucină în cazul factorului XIII al coagulării asociază o reducere a riscului de dezvoltare a infarctului miocardic acut).

---

[1] Riscul este şi mai mare dacă boala apare la o vârsta mai tânără, înainte de 55 de ani la bărbat şi 65 de ani la femeie

[2] Se estimează că peste 250 de gene intervin în patogenia bolii coronariene (Gambaro et al, 2000).

[3] În boala coronariană se întâlneşte deobicei un nivel crescut al LDL-colesterolului, ApoB (fracţia majoră a LDL), Lp(a) şi un nivel scăzut al HDL

Tabelul 13.1 Principalele gene implicate în boala coronariană

Genă	Localizare cromosomică	EFECTE
LDLR (receptorul pentru LDL)	19p32	Gena codifică o proteină receptor care îndepărtează LDL din sânge; s-au descris peste 350 de mutaţii, responsabile de *hipercolesterolemia familială*. Circa o persoană la 500 are o mutaţie a acestei gene care duce la funcţionarea deficitară a proteinei; LDL nu este îndepărtat eficient din circulaţie, concentraţia sa plasmatică creşte şi se produce boală coronariană la o vârstă tânără
APOA1 (apolipoproteina A1)	11q23	Gena codifică APOA1 – o proteină care este legată de colesterol în HDL. Unele variante ale genei produc niveluri scăzute de APOA1. Rezultă o scădere a nivelului plasmatic de HDL şi secundar, boală coronariană precoce.
APOB (apolipoproteina B)	2p24	Gena codifică APOB – o proteină care este legată de colesterol în LDL. Unele mutaţii ale genei produc niveluri crescute de LDL-C şi secundar, boală coronariană precoce.
APOE (apolipoprotein E)	19q13.2	Gena codifică o proteină care este implicată în îndepărtarea LDL din sânge. Unele variante (în special E4) duc la niveluri crescute de LDL, în special dacă alimentaţia este bogată în colesterol.
LPA apolipoproteina(a)	6q27	Gena codifică o proteină care se combină cu colesterolul şi formează particule numite "Lp(a)". Anumite alele se asociază cu niveluri crescute de Lp(a) şi cresc riscul de producere a bolii coronariene.
CETP (proteina de transfer a esterilor de colesteril)	16q21	Gena codifică o proteină care ajută la degradarea HDL. Anumite variante ale genei se asociază cu o degradare mai puţin eficientă a HDL şi nivelul plasmatic creşte, nu este cert că purtătorii acestor variante sunt protejaţi de boală coronariană.
ITGB3 (integrina beta 3)	17a21	Gena codifică o proteină localizată pe suprafaţa plachetelor care au un rol critic în coagulare. Unele variante ale genei sunt prezente la jumătate din pacienţii sub 60 de ani ce fac boală coronariană.
ELN (elastin)	7q11.2	Gena codifică elastina, o componentă a fibrelor elastice din structura arterelor. Deficitul în elastină se asociază cu îngroşarea pereţilor arteriali şi îngustarea lumenului, fenomene ce favorizează ateroscleroza. Pierderea de elastină se produce o dată cu înaintarea în vârstă dar nu se ştie încă dacă acest proces se corelează cu dezvoltarea bolii coronariene.
PTGIS (prostaglandinaI2 sintetaza)	20q13.11	Gena codifică o proteină, prostaciclina, care împiedica adeziunea unor componente chimice ale sângelui la pereţii arteriali.
ACE (enzima de conversie a angiotensinei)	17q23	Gena codifică angiotensina, o proteină ce acţionează asupra rinichilor, miocardului şi pereţilor arteriali. Anumite variante ale genei au fost corelate cu un risc crescut de boală coronariană dar rezultatele investigaţiilor nu sunt încă foarte clare.

O atenţie particulară s-a acordat interacţiunilor dintre factorii de mediu şi gene în producerea bolii coronariene. Astfel s-a evidenţiat o interacţiune semnificativă între fumat (care prin produşii de combustie alterează endoteliul vascular, favorizând ateroscleroza şi tromboza) şi polimorfismul genelor APOE şi lipoprotein lipazei (Humphries et al., 2001): persoanele cu alela E4 a genei[4] pentru apolipoproteina E sau cu alela D9N a genei pentru lipoprotein lipază sunt foarte vulnerabile la efectele adverse ale fumatului şi au un risc foarte mare pentru boala coronariană. Aceeaşi corelaţie a fost identificată între aceste alele şi activitatea fizică (care scade concentraţia plasmatică de lipoproteine). De asemenea s-a stabilit că persoanele cu anumite genotipuri (E2/E3 pentru gena APOE sau B2/B2 pentru gena CETP) nu răspund la modificările dietei (reducerea grăsimilor).

În sfârşit trebuie să subliniem faptul că unii factori genetici influenţează şi răspunsul individual la tratament. Astfel răspunsul pacienţilor la tratamentul cu statine este mai mare la indivizii ce au genotipuri APOE şi CETP asociate cu un prognostic mai defavorabil (alela E4 APO şi alela B1 CETP). Bolnavii coronarieni cu genotipul D/D al genei ACE beneficiază mai

[4] E de la *epsilon*

mult de pe urma tratamentului cu beta-blocante decât indivizii cu genotipurile I/I sau I/D. Deşi aceste date vor trebui mai amplu confirmate înainte de a le utiliza în practică, ele ne arată că în viitorul apropiat un tratament individualizat, bazat pe structura genetică a pacientului, ar putea să amplifice eficacitatea şi să reducă toxicitatea potenţială a medicamentelor. Odată ce un polimorfism este cert corelat cu răspunsul la un anumit medicament, pacienţii vor fi evaluaţi genetic înaintea începerii unui tratament individualizat.

2. HIPERTENSIUNEA ARTERIALĂ

Hipertensiunea arterială (HTA) esenţială (primară) este o boală frecventă (15% din populaţia ţărilor dezvoltate) şi o problemă importantă de sănătate publică (factor major de risc pentru boli cardiace, renale şi accidente vasculare cerebrale). De aceea era firesc ca acest domeniu să fie amplu analizat pentru a stabili etiopatogenia HTA şi, pe această bază, pentru a identifica cele mai bune soluţii terapeutice.

Existenţa unei componente ereditare în producerea HTA a fost sugerată de incidenţa familială a bolii, chiar în condiţiile în care diferiţi membri ai aceleeaşi familii trăiesc în medii diferite, cu factori de risc variaţi. Ereditatea HTA a fost mulţi ani un subiect de confruntare între două ipoteze:

- Pickering (1959) considera că tensiunea (presiunea) arterială (TA) – la fel ca şi alte caractere umane (talia, inteligenţa, ş.a) – este un caracter cantitativ, cu o *distribuţie continuă* în populaţie, şi un determinism poligenic; HTA (valori mai mari de 140 mmH pentru TA sistolică) ar reprezenta variaţia extremă (+2,5DS) a acestei distribuţii;
- Platt (1947) credea că TA are o *distribuţie bimodală* şi un determinsim monogenic.

În timp s-a dovedit că distribuţia bimodală a TA era un artefact şi că HTA esenţială are o etiologie multifactorială (ca şi multe alte boli comune ale adultului), fiind produsă de intervenţia mai multor gene de susceptibilitate al căror efect este modulat de interacţiuni dintre diferite gene şi dintre gene şi mediu. Trebuie însă să precizăm că unele forme familiale de HTA sunt monogenice dar ele afectează o proporţie mică din populaţie.

După stabilirea unui model etiologic multifactorial s-a încercat determinarea contribuţiei relative a genelor şi a factorilor de mediu în determinismul bolii. Mai multe studii au stabilit că heritabilitatea (fracţia genetică din totalul variabilităţii interindividuale) HTA este de 30-60% iar rudele de gradul întâi ale bolnavilor au un risc de 3-4 ori mai mare de a face HTA comparativ cu populaţia generală. Totuşi factorii de mediu (ingestia mai mare de sodiu, activitate fizică scăzută, stress psihoemoţional, obezitate, ş.a) au un rol cauzal important.

Problema esenţială a eredităţii HTA rămâne identificarea multiplelor gene de susceptibilitate şi efectul diferitelor variante alelice în modularea TA. În principiu, anumite alele ale unor gene implicate în dezvoltarea HTA trebuie să fie mai frecvent prezente la hipertensivi decât la normotensivi şi trebuie să segrege/ să se transmită în familie împreună cu HTA.

> La om, s-au realizat două tipuri de cercetări: *studii de înlănţuire* bazate pe o alelă prezentă la perechi de rude afectate (de obicei fraţi) sau *studii de asociaţie*, comparând frecvenţele genice între grupuri de hipertensivi şi subiecţi normali. În ambele cazuri se folosesc fie gene candidat specifice (sugerate de fiziopatologia bolii) fie markeri ADN anonimi cu care se *scanează genomul uman* (se folosesc mai multe sute de markeri distribuiţi la intervale egale în întreg genomul).

Selecţia genelor candidat s-a făcut pe baza cunoştinţelor recente privind mecanismele şi moleculele implicate în reglarea TA; rolul fundamental îl au rinichii, suprarenalele, sistemul nervos care participă la mecanismul presiune-natriureză controlat de sistemul renină-angiotensină (SRA)(figura 13.1).

Au fost identificate şi localizate genele ce codifică diferite componente ale sistemului: gena ADD1 (α-adducină, sensor al modificările presiunii hidrostatice), gena AGT (pentru angiotensinogen, situată pe cromosomul 1q42-q43), gena pentru renină (pe cromosomul 1q32), gena ACE (pentru enzima de conversie a angiotensinei, pe 17q23), gena AT1R (pentru

receptorul angiotensinei, pe 3q21), gena CYP11B2 (pentru aldosteron-sintetază pe cromosomul 8q21), gena SCNN1B (pentru subunitatea-β a canalului de sodiu non-voltaj dependent tip 1 pe cromosomul 16p13-p12). Pentru fiecare dintre aceste gene s-au identificat mai multe variante alelice şi s-a studiat efectul lor asupra concentraţiei plasmatice a produsului, asupra reabsorbţiei tubulare de sodiu sau asupra TA. Rezultatele obţinute până în prezent – mai ales în studiul AGT şi ACE – nu sunt totuşi concludente iar atunci când există o asociaţie semnificativă cu HTA – de exemplu gena pentru angiotensinogen[5] – riscul atribuit genei este modest. Datele actuale permit totuşi câteva concluzii (Barlassina et al., 2002):

- este puţin probabil ca o genă majoră să fie implicată în genetica HTA primare;
- intervin mai multe gene polimorfice, fiecare cu o contribuţie de 2-5% din variaţia genetică, în funcţie de caracteristicile (fondul) genetic şi ecologic al unei anumite populaţii;
- între aceste gene există interacţiuni epistatice – organizate într-o reţea – ce duce la creşterea TA fără a se evidenţia o anomalie evidentă a parametrilor umorali, hormonali sau structurali; prin urmare impactul unei anumite variante alelice asupra TA trebuie să fie evaluat în contextul interacţiunilor cu alte gene;
- efectul unor variante alelice ale unor gene implicate în SRA depinde de vârstă şi de unii factori de mediu (de exemplu, alimentaţia, aportul de sodiu);
- efectul unor medicamente antihipertensive noi (inhibitori de ACE, blocanţi de receptori AT) poate fi influenţat de polimorfismul genelor dar pentru moment nu există consecinţe practice imediate (de exemplu, stabilirea „profilului alelic" al genelor pacientului); aceasta nu înseamnă că ele nu vor fi identificate în viitorul apropiat.

În acest context a revenit în actualitate studiul unor cazuri de HTA produse de boli monogenice rare[6]; bazele moleculare ale unora dintre aceste forme de HTA au fost elucidate şi sunt sintetizate în tabelul 13.2;

Tabelul 13.2 Forme monogenice de hipertensiune arterială

Sindromul	OMIM	Gene implicate	Localizare cromosomică	Funcţia normală a genei/ Mecanismul bolii
Deficienţa de cortisol 11-beta-ketoreductaza	218030	HSD11B2	16q22	Pierderea funcţiei 11-β-hidroxisteroid dehidrogenazei tip 2 permite activarea de către cortisol a receptorilor mineralocorticoizi renali
Hiperaldosteronismul familial tip I	103900	CYP11B1 CYP11B2	8p21	Fuziunea genelor CYP11B2 si CYP11B1 plaseaza producţia aldosteronului sub controlul ACTH
Deficienţa 17-alfa-hidroxilazei	202110	CYP17A1	10q24.3	17-α-hidroxilaza este necesară pentru sinteza cortisolului. Deficienţa sa determină creşterea nivelului ACTH şi a sintezei de deoxicortico-steron şi corticosteron ce produc hipertensiune.
Sindromul Liddle (pseudohipo-aldosteronismul tip I)	177200	SCNN1B SCNN1G	16p13-p12	Reabsorbţia excesivă a sodiului la nivel renal este consecinţa activării constitutive a canalului epitelial de sodiu datorită unor mutaţii cu trunchierea proteinei fie la nivelul subunităţii β, fie a subunităţii γ a acestui canal.
Pseudohipoaldostero-nismul tip II	145260	WNK1 WNK4	12p13 17q21-q22	Aceste gene codifică protein-kinaze care influenţează reabsorbţia paracelulară a ionilor în nefronii distali
Hipertensiunea AD cu debut precoce cu exacerbare severă în cursul sarcinii	605115	NR3C2	4q31.1	Gena codifică receptorul nuclear pentru mineralocorticoizi; mecanismul bolii este incomplet definit
Sindromul Bardet-Biedl tipurile 2 si 4	600374	BBS2 BBS4	16q21 15q22.3-q23	Genele codifică proteine din clasa noua a chaperoninelor; mecanismul bolii nu este bine

[5] Gena AGT are două variante (T235M şi T174M, în care treonina este înlocuită cu metionina în poziţiile 235 şi174) care se asociază semnificativ cu HTA; asocierea a fost demonstrată numai în anumite populaţii şi nu a fost confirmată în alte populaţii datorită probabil unei diversităţi genetice ale acestor populaţii

[6] Cu certitudine, multe cazuri (mai ales prin mutaţii cu efecte mai puţin evidente) nu sunt diagnosticate în prezent

Sindromul	OMIM	Gene implicate	Localizare cromosomică	Funcţia normală a genei/ Mecanismul bolii
				cunoscut

Au fost identificate peste 10 gene ce influenţează reabsorbţia apei şi sodiului în rinichi şi, firesc, a început studiul intervenţiei posibile a acestor gene în HTA esenţială poligenică. Studiul genelor multiple care modifică TA va cunoaşte cu certitudine în anii următori progrese majore ce vor creşte eficienţa diagnosticului, tratamentului şi prevenţiei HTA.

3. DIABETUL ZAHARAT

Diabetul zaharat (DZ) reprezintă un grup heterogen de afecţiuni caracterizat prin hiperglicemie cronică; afectează (în ţările dezvoltate) circa 6% din populaţie. Are o etiologie complexă şi neclară, care implică acţiunea concomitentă a unor gene multiple – ce determină susceptibilitatea la diabet – şi a unor factori de mediu care declanşează apariţia bolii la bolnavii susceptibili; DZ este un prototip de boală multifactorială şi un factor major de risc pentru boli cardio-vasculare, accidente cerebrale, nefropatie, cecitate.

Există două tipuri majore de DZ:

- tipul I – numit şi diabetul insulino-dependent (IDDM) sau diabetul juvenil;
- tipul II – numit şi diabetul nonisulino-dependent (NIDDM) sau diabetul adultului, de 6-10 ori mai frecvent decât tipul I.

Caracteristicile celor două tipuri de DZ sunt sintetizate în tabelul 13.3 Menţionăm faptul că mai există un *diabet secundar* în diferite sindroame genetice sau în alcoolism, în care evident diabetul nu reprezintă unica manifestare a bolii; de asemenea există un *diabet gestaţional* pe care unii autori îl consideră o formă de manifestare a riscului de a dezvolta un DZ ulterior, atât la mamă cât şi la copil[7].

Tabelul 13.3 Caracteristicile majore ale DZ de tipul I şi de tipul II

Caracteristici	DZ tipul I	DZ tipul II
Prevalenţă	1 la 200 persoane	3 la 100 persoane
% din toate cazurile de DZ	15-25%	75-85%
Vârsta de debut	Deobicei sub 40 de ani	Deobicei peste 40 de ani (excepţie tipul MODY)
Secreţia de insulină	Zero	Prezentă dar redusă
Rezistenţa la insulină	NU	DA
Autoimunitate	DA	NU
Asocierea cu HLA	DA	NU
Obezitate	Foarte rar	Frecventă
Concordanţa la gemenii MZ	35-50%	≥ 90%
Risc de recurenţă în fratrie	1-6%	10-15%

Diabetul zaharat tipul I

DZ tipul I este produs de către o deficienţă absolută în secreţia de insulină, ca rezultat al distrugerii autoimune a celulelor beta insulare ale pancreasului; prevalenţa DZ tipul I este de circa 1 la 200 persoane, fiind mai frecvent la copii şi adolescenţi.

În ultimii ani s-au acumulat probe convingătoare care demonstrează că DZ tipul I este o boală autoimună (sau cel puţin are o componentă autoimună importantă) produsă prin distrugerea (autoimună) a celulelor beta ale pancreasului. Dintre acestea menţionăm:

– prezenţa unui infiltrat inflamator (insulită) în insulele Langerhans ale pancreasului;

[7] Expunerea *in utero* la hiperglicemie creşte de circa 8 ori riscul ca noul-născut să facă, la adolescenţă, un DZ

– prezenţa unor anticorpi[8] ce reacţionează cu autoantigenele din celulele insulare (GAD 65, IA-2, insulină);
– asociere puternică cu unele alele HLA de clasă II (DR3 şi/sau DR4, DQ – prezente la circa 95% din bolnavii cu DZ tipul I din populaţiile europene).

Procesele autoimune sunt declanşate de un factor de mediu (foarte probabil o infecţie virală[9]) la persoane cu o anumită susceptibilitate

Există o componentă genetică certă, demonstrată de agregarea familială, concordanţa de 35-50% la gemenii MZ şi riscul crescut la rudele de gradul I ale bolnavilor (tabelul 13.4)

Tabelul 13.4 Riscul de DZ al rudelor bolnavilor diabetici.

Bolanav de DZ (tipul I sau tipul II)	Rude cu risc	Risc (în cazul DZ tipul I)	Risc (în cazul DZ tipul II)
Mama	Copii	3%	15%
Tatăl	Copii	6-9%	15%
Ambii părinţi	Copii	30%	75%
Alt membru al familiei	Fraţii sau surorile sale	6-10%	10%
	Frate geamăn MZ Frtae geamăn DZ	35-50% 20%	90% 10%
	Fraţii sau surorile sale dacă sunt HLA DR3/DR4	20%	-
	Copii săi	10%	33%

Surse: Jorde et al, 1999, NHS (USA) 2002

Cel puţin 20 de gene au fost asociate cu DZ tipul I dar cu excepţia genelor HLA de clasă II (DR3 şi/sau DR4, DQ-beta[10]) – care realizează circa 40% din agregarea familială – celelalte asociaţii sunt slabe; de menţionat totuşi polimorfismul genei pentru insulină (localizată pe braţul scurt al cromosomului 11)

Diabetul zaharat de tipul II

DZ de tipul II este produs printr-un dublu defect: secreţia inadecvată de insulină de către celulele beta şi rezistenţa la acţiunea insulinei atât în ţesuturile periferice (muşchi, adipocite) cât şi în celulele beta determinată de modificări ale receptorilor de insulină sau ale altor molecule implicate în fixarea, transpotul intracelular şi metabolizarea glucozei.

Factorii de risc pentru DZ de tipul II sunt vârsta, alimentaţia, obezitatea, inactivitatea fizică precum şi greutatea mică la naştere ş.a. Există însă şi o vulnerabilitate genetică mai importantă decât în DZ de tipul I, demonstrată mai ales de concordanţa ≥ de 90% a DZ la gemenii MZ şi riscul crescut de recurenţă la rudele de gradul I ale bolnavului (tabelul 13.4). Studiile genetice în DZ tipul II au relevat câteva elemente importante

- Existenţa unor diferenţe etnice în prevalenţa DZ tipul II precum şi a unor genotipuri diferite de vulnerabilitate în populaţii diferite (selectate ca răspuns la diferite presiuni evolutive).

  Astfel s-a identificat într-o populaţie de mexicani din America o genă de susceptibilitate, NIDDM1, localizată pe braţul lung al cromosomului 2 ce interacţionează cu o genă de pe cromosomul 15; în populaţiile finice din Nordul Europei s-au identificat genele NIDDM2 (pe cromosomul 12) şi NIDDM3 (pe cromosomul 20).
- Un procent mic de cazuri de DZ tipul II este produs prin mutaţii monogenice; este vorba de DZ cu debut la maturitate (MODY – de la *Maturity-Onset Diabetes of Youth*) şi alte forme produse prin defecte genetice ale funcţiei celulelor beta sau acţiunii insulinei;

[8] Autoanticorpii apar cu mulţi ani înaintea simptomelor clinice şi sunt un marker util pentru identificarea indivizilor cu risc de a face DZ tipul I

[9] In anumite cazuri pot interveni şi alţi factori din mediu sau structura individului; de ex., intoleranţa la laptele de vacă în copilărie.

[10] De exemplu, haplotipul HLA DRB1*0302-DQA1*0301, în special când este combinat cu haplotipul DRB1*0201-DQA1*0501 creşte de 10-20 de ori susceptibilitatea la dezvoltarea DZ tip 1.

MODY este responsabil de 2-5% din toate cazurile de DZ tipul II; se transmite autosomal dominant şi este produs prin defecte primare în sinteza de insulină. Au fost descrise 5 tipuri de mutaţii: în gena pentru glucokinază (7p13) - MODY 2; în genele ce codifică factorii de transcripţie hepatică ce stimulează celulele beta: HNF-1α (MODY 3), HNF-1β (MODY 5), HNF-4α (MODY 1); în gena pentru factorul de transcripţie pancreatică ce stimulează celulele beta: IPF-1 (MODY 4). Studiile de genetică moleculară în MODY au permis elucidarea funcţiei celulelor beta şi înţelegerea patogeniei altor forme de DZ.

- Preponderenţa maternă a DZ tipul II s-ar putea explica printr-o formă particulară de *diabet mitocondrial* produs de modificări ale ADNmt, moştenite sau câştigate, calitative (deleţii sau mutaţii[11]) sau cantitative (scăderea nivelului plasmatic al ADNmt prin reducerea biogenezei mitocondriilor; mamele cu nivel scăzut al ADNmt nasc frecvent copii cu greutate mică şi cu risc crescut de DZ tipul II)
- La bolnavii cu DZ tipul II există o susceptibilitate individuală clară la anumite complicaţii (nefropatie diabetică, neuropatii, retinopatii sau boli cardio-vasculare).

Heterogenitatea genetică a DZ tipul II contrastează cu patogenia asemănătoare a DZ tipul II în populaţii diferite, ce implică – aşa cum am arătat – rezistenţa la acţiunea insulinei (în ţesuturile ţintă) şi secreţia inadecvată de insulină. Rezistenţa la insulină poate fi produsă de mutaţii sau polimorfisme ale genelor pentru receptorii de insulină sau pentru alte molecule implicate în calea de semnalizare (de exemplu IRS-1, molecula ce primeşte semnalul de la receptorul de insulină). Recent a fost implicată şi gena pentru amilină, peptid cosecretat cu insulina de către celulele beta.

Studiile genetice în DZ au adus date preţioase pentru înţelegerea bolii şi identificarea persoanelor cu risc dar nu au elucidat toate aspectele eredităţii bolii. Ele continuă şi vor aduce cu siguranţă elemente noi.

4. ASTMUL BRONŞIC

Astmul bronşic este o boală pulmonară obstructivă reversibilă care se asociază cu hiperactivitate bronşică (bronhospasm) şi cu inflamaţia căilor aeriene. Incidenţa astmului variază în diferite populaţii între 5-10%) fiind mai frecvent la copii).

Etiologia astmului bronşic este multifactorială: factorii de mediu (alergeni, poluanţi, infecţii virale) declanşează boala la persoane susceptibile. Participarea unor factori genetici care determină predispoziţia la astm şi atopie, în general, este susţinută de caracterul familial frecvent al bolii (astm sau alergie sau niveluri crescute de IgE), riscul crescut de boală la rudele pacientului (de 2-5 ori mai mare ca în populaţia generală) şi incidenţa mai mare la gemenii MZ comparativ cu gemenii DZ (heritabilitatea bolii a fost estimată, în diferite populaţii, qa se situa între 30% şi 70%). De menţionat că atopia (predispoziţie de a dezvolta un răspuns mediat de IgE) este cel mai puternic factor predispozant în astm iar nivelurile crescute de IgE se corelează cu expresia clinică a alergiei şi astmului.

Identificarea genelor de risc – pentru astm sau fenotipurile intermediare (nivelul de IgE, hiperreactivitatea bronşică, atopie) – a fost şi este dificilă deoarece genele responsabile de iniţierea bolii pot fi diferite de genele responsabile de progresia şi/sau severitatea ei. Prin studii de scanare a genomului uman (cu markeri ADN polimorfici) sauprin analiza genelor candidat s-au identificat cîteva regiuni cromosomice (5q23-31, 6p, 11q, 12q) ce conţin gene ce sunt implicate în patogenia astmului. Dintre acestea menţionăm genele pentru citokine (în special IL-4 şi IL-9) şi receptorii lor, adrenoreceptorul 2, glucocorticoid receptorul – toate pe 5q – receptorul pentru IgE (pe 11q) precum şi unele gene ale complexului HLA şi TNF, pe cromosomul 6p.

[11] MIDD (de la *Maternally Inherited Diabetes and Deafness*) este o formă pariculară de diabet mitocondrial prezentă la 1-3% din pacienţii cu DZ tipul II caracterizat prin deficienţă în secreţia de insulină, surditate, transmisie maternă.

Efectul medicaţiei anti-astmatice poate fi influenţat de polimorfismul genelor pentru receptorul adrenergic2 şi receptorul pentru glucocorticoizi sau al genei pentru lipoxigenază; anumite variante alelice determină un răspuns redus la medicaţie.

5. BOLILE NEURODEGENERATIVE: BOALA ALZHEIMER ŞI BOALA PARKINSON

Bolile neurodegenerative sunt afecţiuni neurologice cronice produse prin pierderea progresivă a neuronilor. În funcţie de regiunea SNC afectată şi de prezenţa unor markeri celulari şi moleculari se deosebesc mai multe tipuri, care au o etiologie multifactorială şi/sau monogenică. Cele mai frecvente afecţiuni sunt boala Alzheimer şi boala Parkinson; alte forme mai rare sunt boala Huntington, ataxiile spinocerebeloase, scleroza laterală amiotrofică, atrofia musculară spinală ş.a.

BOALA ALZHEIMER

Boala Alzheimer (5% din persoanele peste 65 de ani) se caracterizează prin atrofie corticală (pierderea neuronilor) şi deteriorare intelectuală lentă dar progresivă (pierderea memoriei, afazie, agnozie, dezorientare temporo-spaţială), până la demenţă. Aceste fenomene se asociază cu o disfuncţie a neurotransmiţătorilor (în special o deficienţă marcată de acetilcolină). Modificările anatomopatologice specifice sunt plăcile senile de amiloid extra-neuronale şi agregatele neurofibrilare. Se cunosc şi bazele moleculare ale acestor modificări. Amiloidul din plăcile senile se formează prin clivarea unei proteine mai mari (*β-amyloid precursor protein* sau, pe scurt APP) de către γ-secretază într-un peptid mai mic, insolubil, – *peptidul amiloid A42* – care se acumulează în plăci. Agregatele miofibrilare sunt formate prin hiperfosforilarea proteinei microtubulare *tau*.

Boala Alzheimer este o afecţiune cu heterogenitate genetică. Circa 6-10% din cazuri debutează precoce, înainte de 65 de ani, şi sunt familiale; o parte dintre ele sunt determinate de mutaţii (transmise autosomal dominant) în genele APP – de pe cromosomul 21[12], presenilină 1 (PSEN1)[13] – de pe cromosomul 14 şi presenilină 2 – de pe cromosomul 1. Studiul acestor forme a permis înţelegerea unor mecanisme patogenice ale bolii Alzheimer.

Majoritatea pacienţilor cu boală Alzheimer sunt însă cazuri sporadice, cu determinism multifactorial; paradoxal, nu s-au identificat mutaţii ale genelor APP, PSEN sau TAU (decât în cazuri rare) deşi mecanismul patogenic pare acelaşi ca şi în formele precoce. În schimb s-a pus în evidenţă un alt factor de risc: APOE 4 – o alelă a genei pentru apolipoproteina E (constituent al LDL); aceasta este prezentă la 50-60% din bolnavi şi dublează riscul purtătorilor de a face boală Alzheimer; printr-un mecanism necunoscut, APOE 4 modifică vârsta de debut cu 5-10 ani mai devreme (la heterozigoţi) şi 10-20 de ani (la homozigoţi). Utilitatea determinării APOE 4 este limitată deoarece aproape 50% din bolnavii cu leziuni certe de boală Alzheimer nu au APOE 4. Descifrarea patogeniei moleculare a bolii Alzheimer continuă şi sunt speranţe de identificarea a unor molecule terapeutice care ar putea incetini evoluţia bolii. Un exemplu îl constituie inhibitorii de secretază care scad producţia şi depozitele de amiloid.

BOALA PARKINSON.

Boala Parkinson (0,5-1% din persoanele peste 65 de ani) este, ca frecvenţă, a doua boală neurodegenerativă după boala Alzheimer. Se caracterizează prin distrugerea progresivă a neuronilor din sistemul extrapiramidal (în special substanţa neagră şi corpii striaţi), asociată

[12] Aşa cum am mai precizat la bolnavii cu trisomie 21 prezenţa unei copii suplimentare a genei APP duce la instalrea precoce a boli Alzheimer.

[13] Ar putea fi secretaza sau un cofactor al acestei enzime.

cu prezenţa unor depozite de proteine ubicuitinate[14] în citoplasma neuronilor (corpi Lewy) sau prelungirile lor (neurite Lewy) şi depleţie de dopamină. Boala Parkinson se manifestă clinic prin: tremurături lente, caracteristice, ale mâinilor şi capului (persistând în repaus), hipertonie extrapiramidală, bradikinezie, rigiditate, instabilitate posturală ş.a.

Studiul unor forme familiale cu debut precoce (autosomal dominante) a permis identificarea unor mutaţii în gena *sinucleinei*, o proteină cu funcţie necunoscută, care se acumulează în corpii Lewy. Alte studii în sindromul arkinsonismului juvenil (autosomal recesiv) au pus în evidenţă mutaţii în gena *parkinei* (6q25), o proteină (din familia E3 ubicuitin-ligazei) sintetizată în SNC şi implicată în metabolismul sinucleinei. În alte forme familiale rare s-au evidenţiat mutaţii în alte gene (de ex., ubicuitin-C-hidrolaza)

Studiul acestor forme rare, monogenice, de boală Parkinson a adus date interesante pentru descifrarea etiopatogeniei formelor adultului; astfel, la circa 5% din aceste cazuri s-au identificat mutaţii în gena parkinei. Totuşi, mecanismele acestei boli nu sunt încă elucidate. Singurul beneficiu concret este utilizarea unei terapii substitutive cu levo-dopa.

5. PSIHOZELE .

Numeroase studii genetice au demonstrat fără echivoc existenţa unei componente genetice importante în două dintre psihozele majore – schizofrenia şi boala (psihoza) afectivă bipolară – cu determinism multifactorial şi, foarte probabil, heterogenitate genetică.

SCHIZOFRENIA.

Schizofrenia (1% din populaţia generală) se caracterizează (după DSM-IV, 1994) prin: ideaţie incoerentă şi delirantă, halucinaţii, disocierea personalităţii, izolarea socială şi autism (repliere în sine însăşi), comportament catatonic sau dezorganizat. Riscul empiric de recurenţă la rudele de gradul I ale bolnavului este de circa 9-12% (deci aproape de 10 ori mai mare ca în populaţia generală), creşte cu numărul bolnavilor şi scade la rudele de gradul II (circa 3%). (Kiney, 1997). Concordanţa bolii la gemenii MZ este de 50% iar la gemenii DZ de numai 12% iar heritabilitatea a fost calculată la 17%. Toate acestea demonstrează existenţa unei componente genetice importante. Dar, în ciuda a numeroase studii moleculare şi a identificării unor regiuni cromosomice (pe 6p, 8p şi 10p) în care ar putea fi localizate genele schizofreniei, nu au fost încă identificate şi clonate gene specifice.

PSIHOZA AFECTIVĂ BIPOLARĂ

Psihoza afectivă bipolară sau psihoza maniaco-depresivă (0,5% din populaţia generală) se caracterizează prin episoade alternative de alterare a dispoziţiei şi nivelului global de activiate, fie în sensul unei dispoziţii euforice şi a hiperactivităţii (manie), fie în sensul unei depresii. Riscul empiric al rudelor de gradul I ale bolnavului este de 5-10%, concordanţa la gemenii MZ este de 79% iar heritabilitatea (70%) arată o componentă genetică puternică. În unele familii, în care boala se transmite autosomal dominant, studiile de înlănţuire au arătat ca boala segregă împreună cu un marker polimorfic de pe cromosomul 11p. Totuşi nu au fost încă identificate gene specifice.

6. CANCERUL

Cancerul este a doua cauză de mortalitate în ţările dezvoltate, după bolile cardio-vasculare. Etiologia bolii canceroase (la care ne vom referi în detalii în capitolul 17) este multifactorială implicând factori de mediu (fumatul, alimentaţia, diferiţi cancerigeni chimici, unele infecţii virale ş.a) care produc mutaţii somatice, precum şi factori genetici care

[14] Ubicuitina este o proteină prezentă în toate celulele, cu rol în reglarea procesului de degradare proteolitică a altor proteine („marcate” prin fixarea ubicuitinei) într-un proteazom

determină susceptibilitatea la unele forme de cancer. Cele mai multe cazuri de cancer (circa 80%) se produc sporadic. Totuşi, este bine stabilit că multe din formele principale de cancer (de sân, colon, prostată, ovarian) pot avea o agregare familială şi riscul de recurenţă este de 2-3 ori mai mare la rudele de gradul I ale bolnavilor (comparativ cu populaţia generală); el creşte cu numărul de bolnavi din familie şi atunci când cancerul apare la o vârstă mai tânără. În majoritatea cancerelor s-au identificat gene specifice care, uneori (de exemplu în cancerul de colon sau de sân), determină şi forme ereditare, monogenice. De aceea medicul practician trebuie să fie deosebit de atent la istoricul familial precum şi la o serie de semne ce pot evoca o formă familială/ereditară de cancer. Acest lucru este important pentru sfatul genetic, supravegherea persoanelor cu risc şi diagnosticul presimptomatic. Toate aceste date vor fi exemplificate prin prezentarea, succintă, a trei forme de cancer, care într-o proporţie de 5-10% din cazuri, au o agregare familială şi/sau sunt ereditare. Alte elemente vor fi discutate în capitolul 17.

Cancerul de sân afectează 10-12% din femeile care trăiesc până la 85 de ani. Poate prezenta o agregare familială rudele de gradul I având un risc dublu de a dezvolta un cancer de sân. Au fost identificate mai multe gene ce predispun femeile la apariţia unui cancer de sân; cele mai importante sunt BRCA1 şi BRCA2, două gene implicate în repararea ADN, gena p53 (ce determină sindromul Li-Fraumeni), gena PTEN (ce produce sindromul Cowden) şi altele. Totuşi, mai mult de 90% din toate cancerele de sân nu sunt ereditare, fiind produse de mutaţii somatice multiple.

Cancerul colorectal (CCR) afectează circa 5% din populaţie şi prezintă deseori un caracter familial. Formele familiale (10%) rezultă – cel mai frecvent – prin mutaţii ale genei supresoare a creşterii tumorale APC (pentru CCR polipozic) sau în genele de reparare a erorilor de împerechere a ADN (pentru CCR nonpolipozic ereditar sau HNPCC). Formele neereditare de cancer de colon (90%) sunt produse de mutaţii somatice multiple, determinate de factori de mediu, deseori în aceleaşi gene implicate în formele ereditare.

Cancerul de prostată este unul din cele mai frecvente tipuri de cancer diagnosticate la bărbat. Intervenţia unor factori genetici este susţinută de existenţa unor forme ereditare, monogenice (5-10% din toate cancerele de prostată) precum şi de polimorfismul unor gene situate pe cromosomul 1q sau pierderea heterozigozităţii pentru alte regiuni genomice. Până în prezent nu au fost identificate gene specifice implicate în patogenia acestei forme comune de cancer.

7. OBEZITATEA

Obezitatea (5-15% din populaţie) este o anomalie metabolică manifestată prin creşterea masei ţesutului adipos şi un exces ponderal de peste 20% în raport cu valorile normale pentru vârstă şi sex. Obezitatea este mai curând un simptom decât o boală dar reprezintă un factor de risc major pentru mai multe boli comune, în special cardio-vasculare şi diabet zaharat tipul II. Obezitatea are un determinism multifactorial, în care alături de factori exogeni (supraalimentaţie, inactivitate) sau endogeni (tulburări metabolice sau endocrine) intervin şi factori genetici predispozanţi. Studiile efectuate pe copii adoptaţi au arătat că greutatea corpului acestora se corelează semnificativ cu greutatea corpului părinţilor naturali iar studiile pe gemeni au evidenţiat o concordanţă mai mare la MZ şi o heritabilitate de 60-80%.

Recent au fost identificate la animale şi om câteva gene care prin produşii lor sunt implicate în controlul apetitului şi în susceptibilitatea la obezitate. Pe primul plan se situează gena pentru *leptină*, un hormon secretat de adipocite, care se fixează pe *receptori* în hipotalamus şi reglează apetitul; nivelurile crescute de leptină produc saţietate şi pierderea apetitului. Din păcate, în obezitatea umană nu au fost identificate (decât foarte rar, în obezităţi extreme, numite şi morbide) mutaţii ale genelor pentru leptină şi nici ale genei pentru receptorul leptinei. Probabil că există mutaţii ale altor gene (încă neidentificate) ce codifică

diferite molecule (neuropeptidul Y, receptorul pentru melanocortina-4) care intervin, în combinaţie cu leptina, în controlul apetitului.

8. ALCOOLISMUL

Alcoolismul cronic (3-10% din populaţie, de 2-3 ori mai frecvent la bărbaţi) reprezintă un complex de tulburări (psihice, nervoase, organice) provocat de ingestia repetată (ani de zile) a unor doze excesive de alcool. Se deosebesc două tipuri majore de alcoolism:

- Tipul I – (2/3 din cazuri) cu debut peste 25 de ani şi mare dependenţă psihologică de alcool; profil psihologic introvertit, băutor solitar.
- Tipul II – (1/3 din cazuri) cu debut sub 25 de ani, predomină la bărbaţi şi tinde să implice indivizi extrovertiţi, cheflii, impulsivi/agresivi.

Alcoolismul este o boală care implică, obligatoriu, o cauză de mediu dar este posibil să intervină şi o *susceptibilitate genetică la alcoolism*. Studiile familiale au evidenţiat o agregare familială evidentă (mai mare în tipul II) şi un risc de a dezvolta alcoolismul pentru indivizii cu un părinte afectat de 3.5 ori mai mare decât al celor fără părinţi afectaţi. Pentru a exclude mediul şi obiceiurile comune favorizante dintr-o familie, s-au efectuat studii pe copii adoptaţi; aceste studii au arătat că urmaşii unor părinţi alcoolici crescuţi de părinţi nealcoolici au un risc de 4 ori mai mare de a deveni alcoolici. În sfârşit studiile concordanţei alcoolismului la gemenii MZ şi DZ au permis calcularea unei heritabilităţi de 21% pentru tipul I şi de 60-80% pentru tipul II, care are evident o susceptibilitate genetică mai mare.

B. MALFORMAŢIILE CONGENITALE MULTIFACTORIALE

Anomaliile congenitale sunt modificări morfologice ale unui organ sau al unei regiuni anatomică produse de tulburări în dezvoltarea prenatală (erori de morfogeneză), prezente la naştere. Din punct de vedere patogenic se clasifică în malformaţii, disrupţii, deformaţii şi displazii congenitale (vezi capitolul 14.B). *Malformaţiile congenitale* sunt produse printr-un proces primar şi intrinsec de morfogeneză anormală. Pot fi *izolate* (unice) sau *multiple* (asociate cu alte anomalii congenitale).

Malformaţiile congenitale izolate sunt considerate boli multifactoriale deoarece pot avea o agregare familială, concordanţa la gemenii MZ este mai mare decât la gemenii DZ iar rudele de gradul I ale bolnavilor au un risc de recurenţă mai mare decât în populaţia generală. Cele mai frecvente malformaţii congenitale multifactoriale sunt menţionate în tabelul 13.5 şi la unele dintre acestea ne vom referi în continuare; alte probleme despre malformaţiile congenitale sunt prezentate în capitolul 14.

Tabelul 13.5. Incidenţa la nou-născuţi, heritabilitatea şi riscul empiric de recurenţă a unor malformaţii congenitale izolate, multifactoriale

Tipul de malformaţie	Incidenţa (‰) la naştere	Heritabilitatea (%)	Riscul de recurenţă (%)
Defectele de tub neural	2-10	60	5[#]
Anencefalia	variabilă		
Spina bifida	variabilă		
Hidrocefalia	0,7	42	2-4
Malformaţiile congenitale de cord	4-8	35	1-4
Defectul septal ventricular	1,7		
Persiatenţa canalului arterial	0,5		
Defectul septal atrial	1,0		
Stenoza aortică	0,5		
Despicăturile labiale cu sau fără despicături palatine	0,4-1,7	76	4
Despicături palatine	0,4		2

Stenoza pilorică	1,5-3	75	2-10*
Luxaţia congenitală de şold	1-5	60	2-11*
Piciorul strâmb congenital	1-3	68	3

Surse: Kingston, 2002; Nussbaum et al, 2001

*Riscul de recurenţă depinde de sexul bolnavului şi a rudei sale de gradul I

Ca şi în alte boli multifactoriale *riscul empiric de recurenţă* al malformaţiilor congenitale izolate este *specific* fiecărei boli în parte, dependent de *frecvenţa bolii în populaţie* şi aproximativ egal cu rădăcina pătrată a incidenţei generale în populaţie (vezi capitolele 5.E.4 şi 9.C). Astfel, pentru malformaţiile congenitale izolate, care au o incidenţă în populaţie de circa 1/1000, dacă doi părinţi sănătoşi, fără alte antecedente familiale, au un copil afectat, riscul de recurenţă la sarcinile următoare este de 1 la 32 sau 3%; acelaşi risc îl au şi descendenţii unui bolnav. Riscul la descendenţi *creşte peste 5%* dacă în familie sunt *mai multe persoane afectate* sau bolnavul prezintă *o formă mai gravă de boală*; în cazul în care *unul din sexe este mai frecvent afectat* (ex. sexul masculin pentru stenoza congenitală de pilor sau sexul feminin pentru luxaţia de şold), riscul de recurenţă este mai mare după naşterea unui copil care aparţine sexului mai rar afectat Astfel, în stenoza de pilor dacă tatăl a fost afectat, riscul de recurenţă este de 5,5% la băieţi şi de 2,4% la fete; dacă mama a fost afectată, riscul este de 19,4% pentru băieţi şi de 7,3% pentru fete.

În acordarea sfatului genetic trebuie să ţinem cont de faptul că în anumite malformaţii congenitale izolate există şi forme rare monogenice (de exemplu, unele cazuri de hidrocefalie pot fi recesive legate de X, autosomal dominante sau recesive) şi mai ales trebuie să ne convingem – prin anamneză şi evaluarea atentă şi minuţioasă a pacientului – că anomalia este izolată şi nu se asociază cu alte anomalii congenitale, uneori minore, într-un sindrom plurimalformativ specific (de exemplu, peste 40% din despicăturile palatine sunt sindromice); în această situaţie etiologia este heterogenă (cromosomică, monogenică, teratogenă) şi riscul de recurenţă este diferit de la un caz la altul.

1. DEFECTELE DE TUB NEURAL

Defectele de tub neural (DTN) – anencefalia şi spina bifida – au o patogenie comună[15] şi, în cazurile familiale, se pot întâlni fiecare la diferiţi membri ai familiei. Incidenţa este variabilă, 0,2-1% în diferite populaţii.

În **anencefalie** se produce un defect de închidere a polului anterior al tubului neural şi encefalul, meningele, calota craniană şi pielea capului sunt absente; se asociază frecvent cu anomalii faciale şi auriculare, secundare. Malformaţia este letală, înainte sau imediat după naştere.

Meningoencefalocelul se produce printr-o herniere a conţinutului cranian datorită lipsei de dezvoltare (breşă) a unor porţiuni din oasele craniului. Localizarea cea mai frecventă este occipitală (figura 13.2) sau fronto-nazală (figura 13.3). Când hernierea interesează numai meningele şi LCR denumirea este de *meningocel*, când herniază atât meningele cât şi creierul poartă denumirea de *meningoencefalocel*. Tratamentul este chirurgical, precoce. prognosticul depinde de gradul de afectare a encefalului.

În **spina bifida** se produce un defect de fuziune a arcurilor vertebrale, cel mai frecvent în regiunea lombară. Există grade variate de severitate, de la *spina bifida oculta*, în care defectul interesează numai arcurile vertebrale, la *spina bifida aperta* (deschisă), în care defectul osos se asociază cu *meningocel* (protruzia meningelui) sau *meningomielocel* (hernierea elementelor neurale şi a meningelui) (figura 13.4). Când interesează întreaga coloană vertebrală poartă denumirea de *rahischizis*. Formele deschise se pot asocia frecvent cu hidrocefalie, picior strâmb congenital, paralizie a membrelor inferioare şi incontinenţă

[15] O malformaţie înrudită cu DTN este encefalocelul posterior (occipital) produs printr-o herniere a meningelui (meningocel) şi uneori a ţesutului cerebral (meningoencefalocel) datorită lipsei de dezvoltare (breşă) a unor porţiuni din oasele craniului.

sfincteriană. Prognosticul este destul de sever: după tratament chirurgical 1/3 din cazurile de spina bifida deschisă supravieţuiesc cel puţin 5 ani, dar 85% dintre acestea vor avea un handicap neurologic grav şi doar 5% vor fi fără handicap.

Majoritatea cazurilor de DTN sunt multifactoriale dar sunt şi cazuri rare produse prin teratogeni (valproat, diabet matern), prin anomalii cromosomiale (trisomia 18) sau prin anomalii monogenice pleiotrope (sindromul Meckel, autosomal recesiv)

În cazurile multifactoriale, determinate de factori genetici şi de mediu, s-a constat că un rol major îl are deficienţa maternă de acid folic: scăderea concentraţiei serice a acestei vitamine sub un prag de 200 μg/L creşte semnificativ riscul de a se produce la făt un DTN. Concomitent cu reducerea nivelului sanguin de folaţi, creşte nivelul de homocisteină şi scade concentraţia metioninei; acest fapt a sugerat existenţa unei anomalii biochimice în reciclarea tetrahidrofolaţilor şi metilarea homocisteinei în metionină. Astfel s-a descoperit că aportul alimentar redus de acid folic are efecte mai ample la persoanele heterozigote pentru mutaţia C677T a genei MTHFR (metilentetrahidrofolatreductaza) care înlocuieşte alanina din poziţia 222 cu o valină şi determină reducerea eficienţei enzimei; circa 5-10% din populaţie este homozigotă pentru această mutaţie.

Important este faptul că introducerea unei *suplimentări de 400-800 μg/zi de acid folic periconcepţional* (o lună înainte de concepţie şi două luni după aceea) scade incidenţa DTN cu peste 75%. Această măsură preventivă poate fi asociată (mai ales în familiile cu risc crescut de recurenţă, datorită altor cauri de DTN) cu screeningul ecografic al gravidelor şi dozarea alfa-fetoproteinei (AFP) în sângele matern şi/sau lichidul amniotic (în sarcinile în care fătul are un DTN se găsesc valori foarte crescute ale AFP).

2. HIDROCEFALIA

Hidrocefalia (0,7‰ nou-născuţi) reprezintă acumularea excesivă de lichid cefalo-rahidian în spaţiile intracraniene, asociată cu creşterea presiunii intracraniene. Se datorează unor tulburări de producere sau/şi de circulaţie a lichidului cefalo-rahidian, determinate de cauze diferite (spina bifida, hemoragii intracraniene, infecţii fetale sau factori genetici).

Aspectul clinic este caracteristic: mărime enormă, uneori gigantă a creierului, în disproporţie evidentă cu dimensiunile faciale şi corporale, fontanelele foarte lărgite şi dehiscenţa oaselor craniene, privirea în "apus de soare" (figura 13.5), circulaţie colaterală la nivelul calotei craniene, atrofia nervului optic cu cecitate, retard psiho-motor important.
Tratamentul chirurgical prin efectuarea unui şunt permanent între craniu şi peritoneu sau vena cavă superioară dă rezultate bune, inteligenţa şi comportamentul neurologic fiind normale în 80% din cazuri.

Majoritatea cazurilor de *hidrocefalie izolată* sunt determinate multifactorial şi riscul de recurenţă este mic, de 2-4%. Există însă şi forme monogenice de hidrocefalie – autosomal dominate sau recesive, precum şi recesive legate de X[16] – care de obicei se asociază cu alte anomalii congenitale (10% din cazuri). În aceste cazuri examenul clinic atent şi ananmneza familială pot contribui decisiv la evitarea unor erori de sfat genetic.

Diagnosticul prenatal este uneori posibil prin ecografie.

3. MALFORMAŢIILE CONGENITALE DE CORD

Malformaţiile congenitale de cord (MCC) sunt foarte frecvente (4-8‰ nou-născuţi) şi variate ca tip de defect, manifestare clinică şi gravitate; oricum ele reprezintă o cauză majoră

[16] Formele de hidrocefalie legate de X – HSAS sau forma clasică, sindromul MASA şi parapareza spastică complicată de tipul1 (SPG1) – sunt determinate de mutaţii diferite în gena *LICAM* de pe Xq28, ce codifică molecula de adeziune L1.

de morbiditate şi mortalitate infantilă. MCC reprezintă un grup heterogen de malformaţii putând fi produse de mutaţii monogenice, anomalii cromosomice sau expunerea gravidelor la teratogeni (infecţia rubeolică, alcoolismul, diabetul matern). Majoritatea cazurilor izolate sunt însă de origine multifactorială. Există totuşi o agregare familială redusă iar copiii afectaţi nu au exact acelaşi tip de MCC, ci mai curând anomalii care au un mecanism de producere similar.

Riscul de recurenţă la rudele de gradul I variază între 2% şi 4% în funcţie de tipul de MCC; la rudele de gradul II riscul se reduce foarte mult la niveluri apropiate de populaţia generală. Multe MCC pot fi în prezent evidenţiate prenatal prin ecocardiografie.

Malformaţiile congenitale de cord pot apare ca o componentă clinică majoră în cadrul unor sindroame genetice (precum tetralogia Fallot în cadrul sindromului velocardiofacial, defectul septal atrial în sindromul Holt-Oram determinat de mutaţii ale genei TBX5 sau defectul atrioventricular în cadrul sindromului Down) ori ca boli monogenice (precum stenoza aortică supravalvulară determinată de mutaţii ale genei pentru elastină). Au fost însă identificate şi mutaţii ale unor gene care predipun la apariţia unor malformaţii de cord izolate, nonsindromice, precum mutaţiile JAG1 şi NKX2E (ce determină tetralogie Fallot) sau mutaţiile CRELD1 (implicate în producerea defectelor septale atrioventriculare izolate). De asemeni, studii de înlănţuire au evidenţiat prezenţa unui locus major de susceptibilitate pentru persistenţa canalului arterial la nivelul cromosomului 12q24.

4. DESPICĂTURILE LABIALE ŞI DESPICĂTURILE PALATINE

Despicăturile labiale (uni- sau bilaterale) cu sau fără despicătură palatină – DL(P) – sunt malformaţii congenitale frecvente, cu o incidenţă medie de 1‰ de nou-născuţi. Din punct de vedere patogenic DL(P) – produse (cam în a 35-a zi de gestaţie) printr-un defect de fuziune a mugurelui frontal cu mugurii maxilari – se deosebesc de despicăturile palatine (DP) fără despicături labiale, care rezultă printr-un defect de fuziune a lamelor palatine a oaselor maxilare. Ambele tipuri, DL(P) şi DP, se prezintă ca malformaţii izolate sau se pot asocia cu alte anomalii congenitale; formele izolate sunt de regulă multifactoriale iar cele asociate (circa 2-11% din DLP şi 20-50% din DP) formează peste 250 de sindroame monogenice, cromosomice sau teratogene. În aceste condiţii evaluarea unui copil cu DL(P) şi mai ales cu DP trebuie să fie completă şi minuţioasă pentru a identifica posibile asocieri cu alte anomalii congenitale, fapt ce ar modifica prognosticul şi sfatul genetic.

Au fost identificate o serie de mutaţii genice care pot creşte riscul apariţiei DL(P). Astfel, mutaţiile TGFA (factorul de creştere tumorală alfa) au fost primele asociate cu creşterea riscului pentru DL(P), dar rezultatele a numeroase studii au fost inconsistente. Se pare ca aceste mutaţii au rol numai în cazurile în care există o agregare familială evidentă. Alte mutaţii genice asociate cu creşterea riscului pentru apariţia unor despicături labiopalatine interesează genele MSX1, TGFB3, GABRB3 şi PVRL1.

Riscul de recurenţă a formelor izolate de DL(P) sau DP – considerate „prototipuri” de boli multifactoriale – creşte o dată cu severitatea afectării, de la DL unilaterale (4%) la DL bilaterale (6,7%) şi de la DL la DLP (8%); de asemenea riscul de recurenţă la rudele de gradul I creşte paralel cu numărul persoanelor afectate în familie, de la 3-4% atunci când există un bolnav (un părinte sau un copil) la 12-14% când există doi bolnavi (un părinte şi un copil sau doi copii afectaţi). În toate aceste cazuri izolate riscurile sunt „acceptabile” având în vedere mărimea, rezultatele foarte bune ale corecţiilor chirurgicale şi posibilităţile de diagnostic prenatal, prin ecografie.

5. ALTE ANOMALII CONGENITALE IZOLATE

Stenoza pilorică hipertrofică infantilă

SPH a reprezentat pentru Carter (1960) modelul folosit pentru elaborarea conceptului de boală poligenică, multifactorială. Incidenţa medie în populaţia Europeană este 1:200 pentru băieţi şi 1:1000 pentru fete, deci malformaţia este de 4-5 ori mai frecventă la sexul masculin decât la cel feminin. Riscul de recurenţă depinde de sexul probandului, fiind mai mare atunci când sunt afectate persoane de sex feminin (tabel 13.6). Unele variante alelice ale genei NOS1 (care codifică oxidaza nitrică neuronală) par a creşte riscul pentru apariţia hipertrofiei pilorice izolate.

Tabel 13.6 Riscul genetic în familiile cu stenoză pilorică (după Carter, 1983)

Risc (%)	Cazul index	
	Sex masculin	Sex feminin
Rude de gradul I		
Faraţi	6,5	10,8
Surori	2,8	3,8
Fii	5,5	18,9
Fiice	2,4	7,0
Rude de gradul II		
De sex masculin	2,2	0,5
De sex feminin	4,3	1,7
Populaţia generală	0,5	0,1

Luxaţia congenitală de şold

Luxaţia congenitală de şold (LCS) reprezintă deplasarea capului femural în afara acetabulei, produsă înaintea sau în timpul naşterii. LCS are o incidenţă de 4-7:1000 nou născuţi vii pentru formele temporare, instabile, (subluxaţii) şi de 1:1000 pentru luxaţiile propriu-zise. Sex-ratio este de 6F:1M.

LCS este de fapt o deformaţie congenitală cu determinism multifactorial; factorii genetici controlează conformaţia acetabulei şi laxitatea articulară. Alţi factori de risc sunt poziţia intrauterină şi prezentaţia pelvină, primiparitatea şi, desigur, sexul fătului (se crede că producţia de estronă de către ovarul fetal şi relaxina de către uterul fetal produc o creştere a laxităţii articulare).

Riscul de recurenţă în fratrie este, în medie, de 5% fiind puţin mai mare dacă probandul este de sex masculin.

Piciorul strâmb congenital

Piciorul strâmb congenital (PSC) este o anomalie congenitală relativ frecventă (1-3‰ nou-născuţi). PSC poate fi o anomalie izolată sau o componentă a mai multor sindroame cu afectare nervoasă sau a ţesutului conjunctiv. În formele izolate determinismul este cel mai probabil multifactorial deoarece studiile genetice relevă o agregare familială; în unele cazuri/familii se observă o segregare Mendeliană. Studiile mai vechi nu prea sunt valabile deoarece astăzi se ştie cu certitudine că sub denumirea de PSC sunt incluse trei entităţi diferite: piciorul equinovarus (abducţia şi flexia plantară a labei piciorului), piciorul calcaneovalgus (flexia dorsală a labei piciorului; suprafaţa plantară priveşte lateral) şi metatarsus varus (adducţia şi inversia labei piciorului). În practica sfatului genetic se folosesc încă riscurile empirice – de 1:50 pentru probandul de sex masculin şi de 1:20 pentru probandul de sex feminin; pentru un părinte afectat de orice sex, riscul la urmaşi este de 1:33.

C. RETARDUL MENTAL

Retardul mental (RM)este definit[17] ca o incapacitate de a dobândi capacităţile cognitive (QI sub 70) şi adaptative corespunzătoare vârstei. Prevalenţa RM este de circa 2-3%; De fapt sub denumirea de RM sunt cuprinse numeroase boli cu etiologie diferită care produc oprirea dezvoltării mentale sau o dezvoltare mentală incompletă, în care este afectată inteligenţa în ansamblul ei. Asupra acestui subiect ne vom referi în detalii în capitolul 15; deoarece inteligenţa este un caracter poligenic, este firesc ca şi cele mai multe din cazurile de RM uşor (QI=50-70) *nespecific* să aibe un *determinism multifactorial*; în formele severe de RM (QI sub 50) cauzele specifice (deseori genetice) sunt mult mai frecvente.

Coeficientul de inteligenţă al urmaşilor este probabil în jurul mediei parentale. De aceea dacă unul sau ambii dintre părinţi au un *RM uşor* riscul unor copii cu RM este mai mare. Riscul de recurenţă depinde de diagnostic dar în RM nespecific (fără o cauză identificată) este de circa 3% pentru rudele de gradul I. Riscul de recurenţă creşte însă după naşterea a doi copii cu RM (25%), părinţii sunt consanguini (15%) sau dacă probandul este de sex masculin (4-5%) (unele cazuri ar putea fi RMLX) .

BIBLIOGRAFIE CAPITOL 13

INTERNET

1. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : (http://geneclinics.org)
2. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omin/
3. Orphanet – bază de date pentru boli genetice(http://orphanet.infobiogen.fr)
4. Programul HELIX (sfat şi teste genetice) al Universităţii şi Spitalului de copii din Washington: http://www.healthlinks.washington.edu/helix/
5. Institutul naţional de cardiologie şi pneumologie (USA): http://www.nhlbi.nih.gov/
6. Web site MedlinePlus web pentru boala coronariană: http://www.nlm.nih.gov/
7. Web site al universităţii din Michigan: http://www.med.umich.edu/

Bibliografie specifică selectivă

1. Aitman TJ- *Genetic medicine and obesity* - N. Engl. J. Med. 2003 348(21):2138-2139.
2. Blumenthal JB, Blumenthal MN - *Genetics of asthma* - Med. Clin. North Am, 2002, 86: 937-950.
3. Cambien F, Tiret L. – *Genetique et pathologie coronarienne* –in "Principes de genetique humaine", ed. Feingold, Fellous, Solignac,Herman ed. Paris, 1998, pp 359-374.
4. Dick DM, Foroud T, Flury L, Bowman ES, Miller MJ et al.- *Genomewide Linkage Analyses of Bipolar Disorder: A New Sample of 250 Pedigrees from the National Institute of Mental Health Genetics Initiative* - Am. J. Hum. Genet., 2003, 73 (in press).
5. Gambaro G, Anglani F, D`Angelo A. - *Association studies of genetic polymorphisms and complex disease* - Lancet. 2000;355:308-11
6. Harrison PJ, Owen MJ – *Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications* – Lancet. 2003 Feb 1;361(9355):417-419.
7. Heilig M, Thorsell A: Brain neuropeptide Y (NPY) in stress and alcohol dependence. Rev. Neurosci. 2002,13: 85-94.
8. Humma L.M,Terra S.G. - *Pharmacogenetics and cardiovascular disease:i mpact on drug response and applications to disease management* –Am. J. Health Syst. Pharm, 2002; 59:1241-1252.
9. Kinney D.K. – *Schizofrenia* - in "Emery and Rimoin's Principles and practice og Medical genetics", 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp 1827-1840

[17] American Association of Menral Retardation, 1992.

10. Kuivenhoven J.A, Jukema J.W, Zwinderman, A.H., et al.- *The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group* – N. Engl. J.Med., 1998;338:86-93.
11. McInnis MG, DePaulo JR – *Major mood disorders* - in "Emery and Rimoin's Principles and practice og Medical genetics", 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp 1843-1849
12. Robinson SW, Morris CD, Goldmuntz E, Reller MD, Jones MA, Steiner RD, Maslen CL. – *Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects* – Am. J. Hum. Genet. 2003, 72: 1047-1052.
13. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, et al. – *Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia* – Am J Hum Genet. 2002 Oct;71(4):877-892.
14. Winkelmann B.R., Hager J., Kraus W.E., et al. - *Genetics of coronary heart disease: current knowledge and research principles* – Am. Heart J. 2000;140:S11-26.

CAPITOLUL 14

GENETICA DEZVOLTĂRII ŞI ANOMALIILE CONGENITALE

Anomaliile congenitale reprezintă o problemă majoră de sănătate publică prin frecvenţa lor ridicată, de 3-5% dintre nou-născuţi, prin morbiditatea şi mortalitatea infantilă care li se asociază. Pentru medici ele pun deseori probleme dificile de diagnostic, mai ales atunci când sunt multiple şi se înscriu într-unul dintre cele peste 2000 de sindroame plurimalformative; pentru părinţi problemele esenţiale sunt îngrijirea şi recuperarea copiilor afectaţi sau/şi prevenirea/ reducerea riscului malformativ la o nouă sarcină; pentru societate profilaxia anomaliilor congenitale şi reducerea consecinţelor malformative este, evident, obiectivul principal.

Etiologia anomaliilor congenitale este în mare parte necunoscută, dar se estimează că o bună parte dintre anomalii sunt determinate de mutaţii ale unor gene care sunt implicate în controlul proceselor de dezvoltare. De aceea, caracterizarea acestor gene a început să producă o profundă schimbare a înţelegerii bazelor moleculare ale anomaliilor congenitale. Ca urmare, acest capitol va începe printr-o introducere în procesele care coordonează dezvoltarea şi va continua cu o discuţie referitoare la perturbările acestor procese, care au ca rezultat apariţia anomaliilor congenitale.

A. GENETICA DEZVOLTĂRII

Procesul de dezvoltare poate fi definit ca fiind ansamblul mecanismelor prin care, pornind de la zigot, se ajunge la un organism matur, capabil de reproducere. Toate evenimentele din cursul dezvoltării – formarea diferitelor tipuri de celule, formarea organelor şi aranjarea spaţială caracteristică a acestora – se desfăşoară conform unui *plan de dezvoltare* ale cărui instrucţiuni sunt codificate în materialul genetic. O definiţie mai largă a dezvoltării ontogenetice include toate procesele care au loc între momentul fecundării şi până la decesul individului.

Din motive etice şi tehnice este dificilă studierea evenimentelor care se produc în cursul dezvoltării embrionare la om. Ca urmare, au fost utilizate o serie de modele experimentale pe animale, care au permis obţinerea unor informaţii ce pot fi extrapolate în mare măsură la om. Acest lucru este posibil deoarece cele mai multe dintre genele şi căile implicate în procesele de dezvoltare prezintă un grad foarte înalt de conservare.

1. CATEGORII DE GENE IMPLICATE ÎN CONTROLUL DEZVOLTĂRII

Genele implicate în dezvoltarea embrionară codifică diverse componente ale unor căi de semnalizare intercelulară, precum factorii de transcriptie, moleculele de semnalizare şi receptorii acestora, componentele matricei extracelulare etc. Se cunosc şapte căi de semnalizare majoră implicate în procesele de dezvoltare: calea de semnalizare *wingless* (Wnt), calea *TGF-β* (factorul de creştere transformant – beta), calea de semnalizare *Hedgehog* (Hh), calea *RTK* (receptor tirozin kinazic), calea *JAK/STAT* (Janus kinza/transductor a semnalului şi activator al transcriptiei), calea *Notch* şi calea *receptorilor nucleari*. Aceste căi sunt implicate în mai multe

procese din cursul dezvoltării embrionare şi acest lucru explică asocierea frecventă a mai multor anomalii congenitale ca urmare a mutaţiei unei gene unice.

1.1. GENE CARE CODIFICĂ MOLECULE DE SEMNALIZARE PARACRINĂ ŞI RECEPTORII ACESTORA.

Interacţiunile dintre celulele vecine sunt mediate adeseori de molecule mici, capabile să difuzeze pe distanţe scurte şi să inducă un răspuns (*semnalizare paracrină*). Se cunosc patru familii majore de molecule de semnalizare paracrină: familia *FGF* (factori de creştere fibroblastică), familia *Hedgehog*, familia *Wingless* şi familia *TGF-β*.

- Factorii de creştere fibroblastică (FGF) sunt glicoproteine cu omologie înaltă care participă la realizarea unor procese biologice diverse: migrarea celulară, creşterea şi diferenţierea. Există cel putin 23 FGF şi 4 receptori (FGFR). FGFR sunt intens exprimaţi în cursul dezvoltării osoase, iar mutaţii lor determină o serie de boli autosomale dominante, caracterizate prin displazie osoasa (vezi caseta 14.4).
- Primul membru al familiei *Hedgehog* a fost izolat la un mutant de la *Drosophila* care prezintă ţepi într-o zonă care este în mod normal netedă (de aceea a fost denumit *hedgehog* – arici). La vertebrate există câţiva omologi ai genei *hedgehog*, cel mai important fiind *Sonic hedgehog* (Shh). Shh participă la specificarea axelor embrionare (vezi mai jos), inducţia plăcii neurale şi modelarea membrelor. Mutaţii ale SHH determină la om **holoprosencefalia** (vezi caseta 14.1). Unul dintre receptorii Shh este o proteină transmembranară codificată de o genă numita *patched*. Legarea Shh la receptorul *patched* determină supresia transcripţiei genelor care codifică membri ai familiilor Wnt şi TGF-β, determinând inhibarea creşterii celulare. Mutaţiile omologului uman, gena PTC, determină **sindromul Gorlin**, caracterizat prin anomalii ale coastelor, chisturi maxilare şi dezvoltarea de carcinoame cutanate bazocelulare.
- Familia genelor Wnt este denumită astfel după gena *wingless* de la Drosophila şi unul dintre omologii săi la vertebrate: gena *integrated*. Gena *wingless* este implicată în stabilirea polarităţii în cursul formării membrelor la Drosophila, iar echivalenţii săi la vertebrate joacă roluri similare. Membrii familiei Wnt (cel puţin 16 gene Wnt la om) codifică glicoproteine secretate care participă la o gamă largă de procese ale dezvoltării, precum specificarea axei dorso-ventrale (Wnt3), formarea creierului, muschilor, gonadelor (Wnt4), cordului (Wnt11), scheletului (Wnt14) şi rinichilor.
- Superfamilia genelor TGF-β este alcătuită dintr-un grup larg de gene înrudite structural care codifică proteine ce formează homo- sau heterodimeri. Membri ai acestei superfamilii sunt familia *TGF-β,* familia *proteinelor morfogenetice osoase* (BMP) şi familia *activinelor*. Ele intervin în numeroase procese ale dezvoltării, precum specificarea axelor (BMP4), dezvoltarea scheletului etc. Un exemplu îl constituie proteina morfogenetică derivată din cartilagii (CDMP1) ale cărei mutaţii produc diverse anomalii scheletice. De remarcat că mutaţii diferite ale aceleiaşi gene pot determina boli diferite (heterogenitate alelică). De exemplu, o mutaţie cu sens greşit este responsabilă de producerea **brahidactiliei** (degete scurte) transmisă AD. Indivizii care sunt homozigoti pentru o duplicatie de 22 pb în aceeaşi genă asociază brahidactilia cu scurtarea oaselor lungi ale membrelor (**displazia acromesomelică** – boală transmisă AR). În sfârşit, o mutaţie cu sens greşit care are efect dominant negativ determină în stare homozigotă **condrodisplazia Grebe**, boală autosomal recesivă caracterizată prin scurtarea severă a oaselor lungi şi a degetelor.

Caseta 14.1.

Holoprosencefalia şi mutatiile SHH

***Definiţie şi frecvenţă**. Holoprosencefalia reprezintă un spectrum de anomalii congenitale caracterizate prin tulburari ale dezvoltării creierului anterior şi ale etajului mijlociu al fetei. Este cea mai frecventa tulburare de dezvoltare a creierului, având o incidenţă de 1 la 10000 până la 1 la 20000 de nou-nascuti. Boala este de doua ori mai frecventă la sexul feminin.*

***Manifestări clinice**. Semnele clinice cardinale ale holoprosencefaliei sunt despicătura labială şi palatină, hipotelorismul (distanţa interoculară redusă) şi absenţa separării lobilor frontali. Severitatea manifestărilor clinice este însă extrem de variată, de la forme uşoare, caracterizate doar prin prezenţa unui incisiv central superior unic sau absenţa parţială a corpului calos, până la forme severe cu ciclopie (ochi unic pe linia mediană), nas cu narina unică (proboscis), absenţa completă a fisurii intercerebrale şi microcefalie. Retardul mintal este prezent la aproape toţi pacienţii şi este corelat cu severitatea malformaţiilor SNC.*

***Etiologie.** Holoprosencefalia este determinată de cauze multiple, de la anomalii cromosomice (25-50% din cazuri), la mutaţii monogenice şi factori de mediu precum diabetul matern. Boală poate să apară izolat sau în cadrul unor sindroame diverse precum sindromul Smith-Lemli-Opitz. Formele nonsindromice de boală pot fi transmise autosomal dominant sau recesiv, ori legat de X. Mutaţiile SHH (Sonic hedgehog), genă localizată pe cromosomul 7q36 au fost primele identificate drept cauza genetică a holoprosencefaliei. Ele sunt responsabile pentru aproximativ 30-40% din formele nonsindromice familiale, transmise autosomal dominant, dar pe ansamblu explică sub 5% din cazurile de holoprosencefalie.*

***Patogenie şi aspecte genetice.** SHH codifică o proteină secretată la nivelul notocordului şi planşeului plăcii neurale, determinând un gradient de concentraţie care dirijează dezvoltarea şi organizarea diferitelor tipuri de celule şi tesuturi la nivelul creierului şi măduvei spinării. SHH este produsă de asemeni la nivelul unui mic grup de celule ale mugurilor membrelor, realizând aşa-numita zonă de activitate de polarizare, care este responsabilă de dezvoltarea asimetrică a degetelor. Mutaţiile SHH ce determină holoprosencefalia sunt mutaţii cu pierderea funcţiei. Transmiterea dominantă a bolii demonstrează haploinsuficienţa care reflectă probabil alterarea magnitudinii gradientului de concentraţie a proteinei, caracteristica cheie în funcţionarea sa. Expresivitatea variabilă a bolii este explicată în parte de implicarea unor mutaţii diverse ale genei, dar asemenea diferenţe fenotipice pot fi întâlnite şi în cadrul aceleiaşi familii, ceea ce presupune intervenţia unor gene modificatoare sau a unor factori de mediu.*

***Sfat genetic şi diagnostic prenatal.** Riscul mamelor diabetice de a da naştere unui copil cu holoprosencefalie este de 1%. În cazul formelor asociate unor anomalii cromosomice, riscul de recurenţă depinde de prezenţa acelei anomalii la unul dintre părinţi şi de tipul particular al anomaliei citogenetice. În formele dominante de boală penetranţa mutaţiei este de aproximativ 70%. Trebuie insistat pe un examen clinic detaliat al părinţilor care pot prezenta forme subtile de boală, precum un incisiv central superior unic sau absenţa frenulei. În formele fără istoric familial sau anomalii citogenetice asociate riscul empiric de recurenţă este de 4-5%. Testarea genetica pentru analiza mutaţiilor SHH nu este disponibilă în prezent în practica clinică. Formele severe de boală pot fi detectate prin ultrasonografie la 16-18 săptămâni de gestaţie.*

1.2. GENE CARE CODIFICĂ FACTORI DE TRANSCRIPŢIE.

Factorii de transcripţie sunt ultima verigă din căile se semnalizare intracelulară care intervin în controlul dezvoltării. Aşa sunt factorii de transcriptie din *familia GLI* (calea de semnalizare *Hedgehog*) sau factorii de semnalizare *TCF* (calea de semnalizare *Wingless*). Există numeroase familii de factori de transcripţie care îndeplinesc roluri majore în controlul dezvoltării, mutaţiile lor determinând anomalii congenitale diverse (vezi bolile produse prin mutaţii ale unor factori de transcripţie – tabelul 11.4). Exemple de gene care codifică factori de transcriptie cu rol major în controlul dezvoltării sunt genele homeobox precum *familiile HOX* (39 gene la om), *PAX* (9 gene), *EMX* (2 gene) şi *MSX* (2 gene), gene cu casetă *HMG* (high mobility group) precum

familia genelor *SOX* (20 gene) şi gene cu caseta T, precum familia genelor *TBX* (15 gene la om).

Domeniul HMG al proteinelor SOX pare să activeze transcripţia indirect, prin facilitarea contactului altor factori de transcripţie cu regiunea promotor a genelor ţintă. Genele SOX acţionează în diverse căi ale dezvoltării. Astfel, gena SOX9 este exprimată în creasta genitala la ambele sexe, dar este hiperexprimată la sexul masculin şi inhibată la sexul feminin înainte de debutul diferenţierii gonadelor. SOX9 reglează de asemeni condrogeneza, controlând expresia genei pentru colagen COL2A1. Mutaţiile SOX9 determină o boală numita **displazia campomelică**, caracterizată prin defecte scheletice şi inversiune sexuală (femei XY). Mutaţiile într-o gena înrudită, SOX10, determină **sindromul Waardenburg-Shah**, caracterizat prin boală Hirschsprung (hipomotilitatea colonului cu megacolon congenital datorită reducerii numărului celulelor nervoase enterice), tulburări de pigmentare şi surditate.

Genele HOX au un rol major în specificarea axei antero-posterioare. Ele vor fi discutate pe larg în cadrul subcapitolului referitor la specificarea axei antero-posterioare. Genele PAX au rol major în dezvoltarea unor organe (de exemplu gena PAX6 în dezvoltarea ochiului). Genele EMX sunt importante în dezvoltarea creierului (mutaţii ale EMX1 determină **schizencefalie**), în timp ce genele MSX sunt implicate în dezvoltarea scheletului. În sfarşit, genele TBX au rol major în dezvoltarea axei antero-posterioare a embrionului.

1.3.GENE CARE CODIFICĂ PROTEINE ALE MATRICEI EXTRACELULARE.

Proteinele matricei extracelulare sunt macromolecule secretate care îndeplinesc un rol major în organizarea tuturor ţesuturilor şi organelor. Tipurile de proteine ale matricii extracelulare au fost prezentate în capitolul 11.C.3. Aceste proteine nu sunt însă doar simple elemente de structură, ci pot media şi o serie de procese extrem de importante în cursul dezvoltării, precum *migrarea celulară*. Aşa se explică faptul că mutaţii ale unor gene care codifică asemenea proteine pot determina boli caracterizate prin apariţia unor defecte de dezvoltare. Exemple sunt **sindromul Marfan,** produs prin mutaţii ale genei pentru fibrilina 1, sau **stenoza aortică supravalvulară** produsă prin mutaţii ale genei care codifică elastina.

2. PROCESE MAJORE ÎN CADRUL DEZVOLTĂRII EMBRIONARE

Din punct de vedere temporal se pot deosebi două perioade majore în cadrul dezvoltării embrionare.

- *Perioada embrionară precoce* se întinde între momentul *fertilizării* şi *gastrulaţie* şi se caracterizează prin dobândirea aspectului trilamelar al embrionului (ectoderm, endoderm şi mezodem). Această etapă este dominată de procesele de *diferenţierea celulară precoce* precum şi de *specificarea axelor*, ambele procese având un rol major în dezvoltarea planului organismului.
- *Etapa embrionară tardivă* este marcată de interacţiunile dintre progamele specifice ale diferitelor tipuri celulre, care vor avea ca rezultat procesele morfogenetice intense de *organogeneză*. Continuă, de asemenea, procesele de diferenţiere celulară care vor conduce la formarea celulelor de tip adult.

2.1. ETAPA EMBRIONARĂ PRECOCE – DEZVOLTAREA PLANULUI ORGANISMULUI

a. Diferenţierea celulară precoce

Toate celulele derivate, prin mitoză, din zigot vor avea *acelaşi genom*. Formarea – prin procesele de diferenţiere celulară – a variatelor tipuri de celule specializate care alcătuiesc organismul uman, implică o serie de mecanisme complexe şi ierarhizate de reglare a expresiei

genice[1], prin care în celule diferite morfologic şi funcţional se exprimă anumite *gene de specialitate*[2]. Expresia lor se află sub controlul unor *gene master* (de coordonare) care stabilesc *momentul ontogenetic al activării* diferitelor gene de specialitate şi adeseori sunt responsabile şi de menţinerea celulei într-un anumit stadiu de diferenţiere.

La zigot, înainte de prima diviziune, procesele necesare vieţii celulare sunt realizate pe seama proteinelor provenite aproape în exclusivitate de la mamă. Ca urmare, o serie de factori materni (proteine prezente în citoplasma ovocitului) pot avea un rol esenţial în cadrul unor procese precoce de reglare a expresiei genice, precum şi în stabilirea unei *asimetrii* a zigotului. O dată cu prima diviziune a zigotului are loc *activarea genomului embrionar* care va conduce la sinteza de proteine necesare pentru diviziunile ulterioare de clivare. Prin aceste diviziuni se formează *blastomerele*, celule care vor alcătui *morula* (în stadiul de 16 celule).

Morula este formată dintr-un grup de celule externe, mai voluminoase, ce înconjoară un grup de celule interne mai mici. Celulele externe vor da naştere *celulelor trofoblastice* care vor forma *corionul*, porţiunea embrionară a placentei. Celulele interne vor constitui, în stadiul de embrion de 32 celule, aşa numita *masă celulară internă*, din care va se va forma embrionul şi anexelor sale (*sacul vitelin*, *alantoida* şi *amniosul*). Distincţia între trofoblast şi masa celulară internă (embrioblast) reprezintă primul eveniment de diferenţiere în cursul dezvoltării embrionare

Blastocistul. Celulele trofoblastice vor secreta un lichid care se acumulează în interiorul morulei, formând o cavitate (blastocel); în acest stadiu embrionul este numit **blastocist** şi are loc procesul de implantare în mucoasa uterină (ziua a 6-a la om).

Până în acest moment al dezvoltării embrionare porţiuni semnificative ale embrionului pot fi îndepărtate fără afectarea dezvoltării normale a embrionului. De exemplu, separarea unui blastocist în două părţi egale poate conduce la dezvoltarea unor *gemeni monozigoţi*. Mai mult, un embrion normal se poate dezvolta chiar dintr-o singură celulă a masei celulare interne. Această capacitate de compensare a unor regiuni care sunt alterate sau îndepărtate este denumită *dezvoltare reglabilă*. Acest fenomen are consecinţe importante pentru reproducerea umană întrucât permite îndepărtarea fără consecinţe a unor celule pentru *diagnosticul preimplantator* şi protejează embrionii împotriva acţiunii teratogenilor în cursul primelor două săptămâni după concepţie (răspuns de tipul "totul sau nimic").

Gastrulaţia. În a doua săptămână de dezvoltare începe procesul de gastrulaţie (zilele 14-28) prin care celulele blastocistului migrează şi se rearanjează, formând în final embrionul trilaminar, cu cele trei pături germinative definitive – ectodermul, endodermul şi mezodermul. Formarea acesturi pături este o premiză obligatorie pentru etapa următoare de organogeneză. Gastrulaţia include şi formarea ţesuturilor extraembrionare, ce derivă din trofoblast.

- Gastrulaţia începe cu diferenţierea celulelor embrioblastului în două straturi (discul germinativ bilaminar): unul intern, aşa-numitul *hipoblast* (sau endodermul primitiv) şi altul extern, denumit *epiblast* (care va genera în final întregul embrion) (figura 14.1).
- Evenimentul major al gastrulaţiei (cu care începe săptămâna a treia a dezvoltării) este formarea *liniei primitive*, care apare ca o îngroşare a ţesutului epiblastic, cu originea în porţiunea posterioară a embrionului (la nivelul nodului Hensen) şi orientare antero-posterioară. De-a lungul acestei structuri au loc procese intense de *migrare* a unor celule epiblastice (figura 14.2) care vor forma mai întâi endodermul definitiv şi apoi mezodermul; concomitent epiblastul este transformat în ectoderm şi astfel se constituie *embrionul trilaminar*. Genele exprimate în timpul gastrulaţiei codifică proteine care facilitează mişcările celulare.

---

[1] Mecanismele de reglare a expresiei genice acţionează la mai multe niveluri ale expresiei genice şi implică transcripţia diferenţială a genelor, procesarea selectivă a ARNm la nivel nuclear, translarea selectivă a ARNm în citoplasmă sau modificarea diferenţială a proteinelor care le permit acestora să devină sau nu funcţionale (vezi capitolul 4.D).

[2] Genele care asigură desfăşurarea proceselor esenţiale pentru viaţa celulară, numite şi gene menajere (*housekeeping genes*) se exprimă în toate tipurile de celule.

- **Formarea mezodermului** este un element important al gastrulaţiei Mezodermul se împarte în cinci componente: notocordul, mezodermul dorsal, intermediar şi lateral şi mezenchimul capului. *Notocordul* este o structură tranzitorie situată pe linia mediană, care induce formarea tubului neural şi este implicat în specificarea axelor. *Mezodermul* dorsal (paraxial) se segmentează în somite, care dau naştere elementelor ce formează scheletul axial, muşchii scheletici şi ţesutul conjunctiv al tegumentelor. *Mezodermul intermediar* va forma rinichii şi aparatul genitourinar. *Mezodermul plăcii laterale* va constitui cordul, ţesutul conjunctiv al viscerelor şi elementele conjunctive ale amnionului şi corionului. În sfârşit, *mezenchimul* capului va da naştere muşchilor capului şi muşchilor extrinseci ai globilor oculari.
- **Endodermul** embrionar va forma tractul digestiv, ficatul şi pancreasul, precum şi aparatul respirator; endodermul produce, de asemenea, şi pungile faringiene care, împreună cu celule migrate din crestele neurale vor da naştere urechii medii, timusului, paratiroidelor şi tiroidei. Numeroase structuri derivate din endoderm se realizează prin înmugurire şi ramificare; aceste procese sunt controlate de *factorii de creştere fibroblastică (FGF) şi proteinele morfogenetice osoase (BMP)* împreună cu *receptorii lor.*
- **Ectodermul** embrionar va forma epidermul şi anexele pielii, sistemul nervos central şi periferic, adenohipofiza, glandele parotide şi glandele mamare.

Neurulaţia. O dată ce s-a format embrionul trilamelar, mezodermul dorsal şi ectodermul de deasupra vor interacţiona şi vor *induce* formarea tubului neural. Acest proces numit *neurulatie* este un un punct critic în dezvoltarea embrionară deoarece iniţiază organogeneza şi divide ectodermul în trei populaţii principale de celule: *tubul neural*, care va forma creierul şi măduvă spinării, *epidermul* tegumentelor şi *celulele crestei neurale*.

La om, tubul neural începe să se închidă la nivelul a cinci sedii separate, care corespund localizărilor cele mai frecvente ale defectelor de tub neural, cum sunt anencefalia, encefalocelul occipital şi spina bifidă lombară. Celulele crestei neurale vor migra de la nivelul neuroepiteliului pe rute bine definite către ţesuturile periferice unde se vor diferenţia în diferite tipuri de celule precum neuronii senzoriali, melanocitele, neuronii ganglionilor intestinali sau celulele musculare netede. Afectarea celulelor crestelor neurale va determina producerea de anomalii aparent necorelate, localizate la distanţă, în structurile astfel diferentiate dar care pot fi grupate in aceeasi categorie de afectiuni numite neurocristopatii (vezi caseta 14.2)

Caseta 14.2

Neurocritopatiile

In 1974, Bolande a introdus conceptul de neurocristopatii referitor la câteva tumori ce implică ţesuturi cu aceeaşi origine embrionară (feocromocitom, neuroblastom etc); ulterior termenul a fost folosit pentru toate defectele de dezvoltare despre care se poate afirma cu certitudine că au la origine anomalii ale crestei neurale. Celulele crestelor neurale sunt diseminate în tot embrionul si se diferenţiază în structuri dintre cele mai diverse (melanocite, ţesutul conjunctiv al feţei, structuri cardiace, sistem nervos enteric etc) astfel încât neurocristopatiile pot fi încadrate în categoria defectelor de câmp politopic. Din punctul de vedere al dezvoltării emrionare, maladii extrem de variate ca aspect clinic şi localizare sunt privite ca fiind generate de aceleaşi structuri embrionare tranzitorii, crestele neurale derivate din placa neurala. Derivatele crestelor neurale, sindroamele asociate şi genele implicate sunt următoarele:

- *Rombomere: R2-R3 (primul arc branhial) – sindromul Goldenhar, sindromul Franceschetti (5q32); R4-R5 (al doilea arc branhial) – sindromul Moebius; R6-R8 (al treilea şi al patrulea arc branhial) – secvenţa Pierre Robin, sindromul Velo-cardio-facial (microdeleţii 22q11.2 sau 10p14)*
- *Melanoblaste: Piebaldism (cKIT), sindromul Waardenburg (PAX3, MITF)*
- *Neuroblaste : boala Hirschprung (cRET, EDN3, EDNRB, GDNF)*
- *Celule C ale tiroidei şi suprarenalelor: MEN 2A, MEN2B, FMTC*
- *Tumori: feocromocitom, neuroblastom, cancer tiroidian medular*

Caracteristicile esenţiale ale dezvoltării embrionare precoce. În acest proces un element important îl constituie *evoluţia ierarhizată* a programelelor de dezvoltare şi *restricţia progresivă* a potenţialului de diferenţiere (figura 14.3).

Aşa cum am arătat, celulele din porţiunea externă a blastocistului vor da naştere la componenta fetală a placentei şi la structurile extraembrionare, în timp ce celulele masei celulare interne vor forma embrionul. La fel, din ectodermul primitiv se formează neuroectodermul care va genera, printre altele, celulele crestei neurale (ce vor da naştere, de exemplu, melanocitelor şi altor tipuri celulare). Cu alte cuvinte, fiecare celulă la un moment dat al dezvoltării se află într-o anumită etapă a programului său de dezvoltare, care îi va hotărî soarta sa (*cell fate*). Modul specific, previzibil şi repetabil în care o anumită celulă sau regiune embrionară va evolua prin diferenţiere pentru a da naştere anumitor structuri specifice se numeşte **predestinare** („*commitment*"); prima fază a procesului de atribuire a predestinării celulare, în care evoluţia spre diferenţiere a celulei este variabilă, în funcţie de stimulii din mediu extern se numeşte *specificaţie*; a doua fază a procesului de atribuire a predestinării celulare, în care direcţia de dezvolatre a celulei nu mai poate fi influenţată din mediul embrionar exterior (autonomie celulară) se numeşte *determinare*

Evoluţia ierarhizată a programelor de dezvoltare este realizată în mare măsură prin intervenţia unor *factori de transcripţie cu specificitate tisulară*, care vor alcătui *combinaţii specifice* pentru anumite structuri. Ca urmare, mutaţii ale unor asemenea factori de transcripţie vor determina anomalii congenitale care afectează preponderent ţesuturile la nivelul cărora aceste gene sunt exprimate.

Un exemplu edificator pentru rolul factorilor de transcripţie cu specificitate tisulară este mutaţia genei PAX3 care determină sindromul Waardenburg. PAX3 este un factor de transcripţie exprimat în cursul dezvoltării la nivelul crestei neurale, precum şi la nivelul mezodermului somitelor, ce va da naştere muşchilor scheletici şi dermului. Mutaţiile PAX3 cu pierderea funcţiei determină **sindromul Waardenburg** caracterizat prin deficienţa dezvoltării structurilor derivate din creasta neurală, precum melanocitele de la nivelul firelor de păr, ochilor şi urechii interne, ceea ce conduce la aspectele caracteristice ale bolii: prezenţa meşei albe de păr frontale, heterocromia iriană şi surditatea senzorială. În plus pacienţii cu mutaţii PAX3 prezintă hipertelorism şi, ocazional, anomalii ale extremităţilor superioare ale membrelor (sindromul Waardenburg tip III).

Menţinerea diferenţierii presupune transmiterea stabilă a modelului de expresie genică în succesiunea generaţiilor de celule; acest fenomen implică intervenţia unor mecanisme de *reglare epigenetică* (modificări specifice ale conformaţiei cromatinei şi metilarea ADN).

Un alt fenomen foarte important în cursul dezvoltării embrionare precoce îl constituie *migrarea celulara* (de exemplu, migrarea celulelor crestei neurale, celulelor germinale sau celulelor hematopoietice). Bazele moleculare ale acestor fenomene de migare sunt încă înţelese numai parţial, dar un rol major i s-a atribuit unei serii de molecule implicate în *semnalizarea paracrină* sau molecule care asigură *adeziunea celulară*.

b. Specificarea axelor

La om, ca şi la restul cordatelor, există trei axe a căror *specificaţie* joacă un rol major în orientarea planului corpului: axa antero-posterioară, axa dorso-ventrală şi axa stânga-dreapta. Controlul acestor procese implică intervenţia unor proteine care mediază adeseori şi alte procese în cursul dezvoltării, precum organogeneza.

Specificarea axei antero-posterioare este declanşată odată cu formarea liniei primitive.

La extremitatea anterioară a liniei primitive există o structură numită *nodul Hensen* unde are loc expresia genei NODAL (membru al familiei TGF-β), care este necesară pentru iniţierea şi menţinerea liniei primitive, iar mai târziu are un rol important în formarea axei stânga-dreapta.

Controlul *specificării* axei antero-posterioare este realizat de către o serie de gene care codifică factori de transcripţie care au un domeniu de legare la ADN numit *homeodomeniu*. Aceste gene numite şi **gene homeotice** sunt reprezentate la om de **genele HOX**. Anumite *combinaţii* ale genelor HOX marchează diferite regiuni în lungul axului antero-posterior al corpului şi membrelor, determinând o evoluţie specifică. Mutaţiile genelor HOX determină anomalii în modul de dezvoltare a corpului, membrelor şi dfieritelor organe

Genele homeotice au fost descrise initial la *Drosophila*[3] şi numite gene HOM-C. Echivalentul lor la om sunt **genele HOX.** Cele 39 de gene sunt grupate în patru regiuni cromosomice care conţin fiecare până la 11 gene: 11 gene HOXA (1-7, 9-11 şi 13, cromosomul 7p15-p14.2), 10 gene HOXB (1-9 şi 13, cromosomul 17q21-q22), 9 gene HOXC (4-6 şi 8-13, cromosomul 12q13) şi 9 gene HOXD (1, 3, 4, şi 8-13, cromosomul 2q31-

[3] Mutaţiile genelor HOM-C determină înlocuirea antenelor cu formarea unor picioare, fenotip denumit *Antennepedia*.

q32). Genele sunt numerotate în funcţie de omologia lor (genele cu numărul 1 aflându-se în extremitatea 3', iar genele cu numărul 13 în extremitatea 5'); astfel, genele HOXA13, HOXB13, HOXC13 şi HOXD13 sunt omologe şi numite *paralogi*. Paralogii au un grad mai crescut de omologie decât genele situate la nivelul aceluiaşi grup (*cluster*) de gene. Important este faptul că exprimarea acestor gene se realizează în direcţia 3'-5' de-a lungul axei antero-posterioare a embrionului (*coliniaritate spaţială*) precum şi totodată faptul că genele situate 3' sunt exprimate mai precoce decat genele situate în poziţia 5' (*coliniaritate temporală*). Astfel, expresia genei HOXA1 este mai precoce şi într-o poziţie anterioară faţă de expresia genei HOXA2 (figura 14.4). În realitate există o suprapunere parţială a regiunilor care exprimă un anumit set de gene HOX. *Combinaţiile* particulare care rezultă *specifică*, determină, foarte probabil poziţia celulelor şi ţesuturilor, determinând regiuni specifice de-a lungul trunchiului şi ale membrelor.

Specificarea axei dorso-ventrale este un proces activ aflat sub controlul a doi centri de semnalizare: nodul Hensen şi endodermul visceral anterior care produc semnalele de dorsalizare (*Noggina* şi *Chordina*) şi ventralizare (proteina *BMP4*).

Nodul Hensen conţine o serie de celule ce formează *organizatorul Spemann-Mangold* care exprimă aproape în exclusivitate două proteine esenţiale: *Noggina* şi *Chordina*. *Noggina* este o proteină secretată care induce formarea ţesutului neural din ectoderm şi dorsalizarea mezodermului vecin. *Chordina* este o altă proteină secretată care previne ventralizarea mezodermului dorsalizat. În contrast, endodermul ventral anterior secretă proteina *BMP4* care induce ventralizarea mezodermului vecin, precum şi *factorii de transcripţie LIM1, OTX2, HESX1* sau factorul paracrin *Cerberus*.

În prezent se ştie că *Noggina* şi *Chordina* se leagă direct la BMP4 şi previn legarea sa la nivelul receptorului corespunzător. Ca urmare, organizatorul promovează dorsalizarea prin reprimarea semnalului de ventralizare codificat de către proteina BMP4 (figura 14.5.).

Specificarea axei stângă-dreapta. Poziţia finală a organelor dispuse asimetric este dobândită prin mecanisme diferite.

Unele organe (cord, ficat) se dezvoltă iniţial pe linia mediană, pentru a deveni lateralizate ulterior în cursul dezvoltării. Alte organe (precum unele vase sanguine) se dezvoltă iniţial ca structuri pereche, iar ulterior, prin regresia unuia, lasă o structură lateralizată. În sfârşit, există organe (de exemplu plămânii drept şi stâng) care se dezvoltă de la început că organe asimterice faţă de linia mediană. Inţelegerea mecanismelor moleculare care dirijează specificarea axei stânga-dreapta s-a realizat prin studii pe modele animale precum şi prin studiul unor anomalii congenitale denumite **defecte de lateralitate** (1 la 10.000 de naşteri)**,** în care acest proces este perturbat. Poziţia normală a organelor în raport cu axa stânga-dreapta este numită *situs solitus*. Imaginea completă în oglindă a aranjării organelor în raport cu această axă este numită *situs inversus* (de obicei asimptomatică). Modificări în dispoziţia unor organe asimetrice, altele având o poziţie normală, sunt denumite *situs ambiguus (heterotaxie).*

Procesul prin care este stabilită asimetria stânga-dreapta poate fi împărţit în patru etape (figura 14.6.). Evenimentul iniţial pare a fi alterarea simetriei în apropierea nodului Hensen, proces care are loc în stadiul tardiv al formării şanţului neurale. Celulele din porţiunea ventrală a nodului sunt celule monociliate, cilii rotindu-se rapid (600 rpm) în sens orar (priviţi din partea ventrală). Această mişcare de rotaţie determină un *flux nodal* către stânga al lichidului extraembrionar din apropierea nodului[4], care ar putea fi implicat în transportul unor molecule cheie, precum factorul de diferenţiere/creştere tip 1 (GDF1) sau proteina *Nodal*.

O legatură între mişcarea ciliară şi determinarea axei stânga-dreapta a fost suspectată din momentul descoperirii faptului că **sindromul Kartagener** – o boală genetică relativ rară care include situs inversus (poziţie în oglindă a organelor interne). În acest sindrom s-a observat pierderea motilităţii cililor epiteliului respirator şi al flagelului spermatozoizilor, datorită unor mutaţii ale dineinei, o proteina cu activitate motorie asociată microtubulilor. Dineina ar putea interacţiona cu ZIC3 (proteina cerebelară cu degete de zinc tip 3), un factor de transcripţie din familia GLI localizat pe cromosomul X. Mutaţii ale acestei gene au fost identificate de asemeni la pacienţi cu defecte de lateralitate.

Alterarea iniţială a simetriei determină exprimarea exclusivă pe partea stânga a proteinei *Nodal*, moleculă din familia TGF-β. Acţiunea *Nodal* este inhibată de către o altă moleculă din familia TGF-β, proteina *Lefty2* (LEFTB la om), care actionează ca o moleculă de feedback negativ. Expresia stânga a *Nodal* şi *Lefty2* începe, în stadiul de 2-3 somite, într-o mică regiune

[4] Fluxul nodal este afectat la şoareci mutanţi care prezintă *situs inversus*, ceea ce susţine implicarea fluxului nodal în determinarea axei stânga-dreapta.

din vecinătatea nodului, se extinde bidirecţional de-a lungul axei antero-posterioare şi dispare către stadiul de 6-7 somite. Semnalul indus de *Nodal* este mediat de către un factor de transcriere, Pitx2 (la om PITX2, gena implicată în producerea sindromului Rieger). Genele situate în aval, responsabile de morfogeneza asimetrică, nu sunt încă cunoscute. În sfârşit, Nodal induce şi expresia unei a treia molecule din familia TGF-β, proteina Lefty1 (la om LEFTA), care acţionează ca o barieră mediană a semnalelor ce determină specificarea părţii stângi a corpului.

2.2. ETAPA EMBRIONARĂ TARDIVĂ – ORGANOGENEZA

Această etapă este dominată de procese intense de *morfogeneză* care au că rezultat final constituirea organelor şi sistemelor în forma lor finală. Continuă de asemenea procesele de *diferenţiere celulară* iniţiate în etapa precedentă, care vor conduce la formarea celulelor înalt diferenţiate, de tip adult (precum melanocitele, fibroblaştii sau keratinocitele). Evoluţia specifică a acestor celule a fost însă deja prestabilită în etapa de dezvoltare embrionară precoce (de exemplu, dezvoltarea melanocitelor are loc din celulele crestei neurale). Proceselor de diferenţiere celulară li se adaugă procese intense de *proliferare celulară* care sunt responsabile de creşterea rapidă a dimensiunilor embrionului şi ulterior a fetusului. Între procesele de diferenţiere celulară şi cele de proliferare există însă adeseori o relaţie de inversă proporţionalitate: pe măsura creşterii gradului de diferenţiere scade potenţialul de proliferare, celulele înalt diferenţiate fiind frecvent lipsite complet de capacitatea de diviziune celulară. Ca urmare, asigurarea proceselor de creştere (inclusiv postnatale), precum şi a celor de reparare celulară este posibilă în bună parte pe seama *celulelor stem*. Aceste celule îşi păstrează capacitatea de multiplicare de-a lungul întregii vieţi (prin mecanisme complexe, precum menţinerea activităţii telomerazei). În sfârşit, proceselor de proliferare li se adaugă şi procese inverse, de *apoptoză* (sau moarte celulară programată). Acest proces este extrem de important în formarea organelor şi va fi prezentat separat în cadrul subcapitolului 14.A.3.

Un fenomen important care precede organogeneza este *formarea modelelor,* procesul prin care celulele diferenţiate sunt aranjate spaţial formând ţesuturi şi organe. Specificarea regională are loc în mai multe etape: (1) definirea celulelor dintr-o regiune; (2) stabilirea centrelor de semnalizare care furnizează informaţii poziţionale; (3) diferenţierea celulelor din regiunea respectivă ca răspuns la semnale adiţionale. Spre exemplu, celulele ce vor forma membrele superioare se diferenţiază în condrocite, osteocite etc; aceste celule trebuie însă să fie aranjate într-un model temporo-spaţial care să formeze un os funcţional. Alte informaţii vor stabili dacă acest os va deveni humerus, radius sau cubitus şi va ocupa o poziţie specifică. Pentru formarea modelelor, celulele şi ţesuturile *comunică* unele cu altele, folosind diferite căi de semnalizare

Aşa cum se poate intui însă, o serie de gene care au fost inactive până în momentul iniţierii organogenezei devin active în cursul acestor procese de dezvoltare. Mutaţiile unor gene care au un rol determinant în această fază sau mutaţiile cu efecte letale care perturbă evenimentele anterioare ale dezvoltării pot produce anomalii ale diferitelor structuri şi organe.

În cele ce urmează vom prezenta câteva date succinte privitoare la controlul dezvoltării cordului şi membrelor, anomaliile acestora fiind cele mai frecvente anomalii congenitale. Dezvoltarea organelor genitale, cea mai bine înţeleasă în prezent, va constitui subiectul subcapitolului 14.C.

a. Dezvoltarea cordului

Formarea cordului implică o serie de evenimente precis orchestrate (care implică intervenţia a numeroase şi variate gene). Prezentarea reperelor embriologice şi a genelor implicate în dezvoltarea cordului urmăreşte să demonstreze complexitatea moleculară a acestui proces, redat sintetic în figura 14.7, precum şi corelaţia dintre mutaţiile genelor şi diferite

malformaţii cardiace (caseta 14.3). Malformaţiile congenitale de cord sunt cele mai frecvente defecte de dezvoltare (6-8 la 1000 nou-născuţi) şi reprezintă principala cauză de deces la copii (excluzând bolile infecţioase)

Primul eveniment major în dezvoltarea cordului îl constituie *specificarea* celulelor cardiace – *cardiomiocitele.*

Aceste celule iau naştere la scurt timp după gastrulaţie, la nivelul mezodermului lateral anterior. Ele sunt produse ca răspuns la o serie de factori proteici precum *proteinele morfogenetice ososase* (BMP2 şi BMP4) secretate de către endodermul adiacent. Semnalele rezultate determină *activarea unor gene* ce codifică factorul de transcripţie NKX2.5 (echivalentul genei *tinman* de la *Drosophila*), factori de transcripţie din familia GATA (GATA4, 5 şi 6) şi factori de transcripţie cu caseta T (TBX1 şi TBX5).

O parte dintre celulele cardiace evoluează divergent şi vor da naştere *sistemului de conducere;* un rol major în acest proces îl au genele care codifică endotelina 1, conexina 40 şi factorul de transcripţie HF1B.

La scurt timp după specificare, celulele musculare cardiace converg de-a lungul liniei mediane ventrale a embrionului şi formează, în săptămâna a patra, **tubul cardiac** (ce începe să pulseze); tubul cardiac prezintă o pătură miocardică şi una endocardică, separate printr-o matrice extracelulară. Aceste proces este guvernat de factori de transcripţie din familia GATA. O dată format, tubul cardiac suferă o *încurbare către dreapta*, acest proces fiind ghidat de către căile moleculare implicate în stabilirea asimetriei stânga-dreapta (vezi mai sus). Incă înainte de încurbarea tubului cardiac acesta este *segmentat* de-a lungul axului antero-posterior în precursorii viitoarelor camere ale cordului: *sacul aortic, porţiunea conotruncală, ventriculii pulmonar şi sistemic şi atriile*.

Fiecare din aceste camere diferă prin caracteristicile sale morfologice şi contractile, ca şi prin tipurile de gene exprimate. *Formarea ventriculilor* este dependentă de expresia genei IRX4, aflată sub controlul genei NKX2.5. Factorul de transcripţie HAND1 controlează formarea ventriculului stâng, în timp ce expresia HAND2 şi a versicanului guvernează formarea ventriculului drept. Un cofactor pentru dezvoltarea ventriculilor este şi proteina MEF2C. *Dezvoltarea atriilor* se află sub controlul receptorului nuclear orfanic COUP-TFII şi a factorului de transcripţie PITX2. Proliferearea cardiomiocitelor este controlată de neuregulină, receptorii ERBB2 şi ERBB4 şi factori angiogenici precum VEGF şi angiopoietina 1. Defecte ale acestor factori asociază anomalii ale trabeculaţiei ventriculare.

O altă etapă importantă în dezvoltarea cordului este *separarea celor patru camere* realizată prin dezvoltarea septurilor interatrial, interventricular şi formarea valvelor.

Mediatori majori ai procesului de dezvoltare a septurilor interatrial şi interventricular sunt NKX2.5 şi TBX5, mutaţiile acestor gene fiind descrise la pacienţi cu DSA sau DSV (vezi caseta 14.2). Dezvoltarea valvelor atrioventriculare şi ventriculoarteriale este mediată în parte de membri ai familiei TGF-β care induc transformarea celulelor endoteliale precursoare în celule mezenchimale. Alţi mediatori sunt genele NFATC (factor nuclear dependent de calcineurină) şi SMAD6 (mutaţiile lor determină la şoareci valve îngroşate şi cu aspect gelatinos, asemănătoare cu cele întâlnite în bolile umane).

In sfârşit, *separarea circulaţiei sistemice de circulaţia pulmonară* este asigurată în parte pe seama migrării celulelor crestei neurale care vor separa trunchiul arterial în aorta şi artera pulmonară şi vor da naştere porţiunii conotruncale a septului ventricular.

Celulele crestei neurale au de asemeni rol în dezvoltarea *canalului arterial* şi a porţiunilor proximale ale aortei, arterelor subclaviculare, carotide şi pulmonare. Perturbări ale specificării sau migrării celulelor crestei neurale au drept consecinţa anomalii ale acestor regiuni care constituie circa 30% din toate anomaliile cardiace la om. Printre factorii care controlează migrarea şi dezvoltarea celulelor crestei neurale se numără endotelina 1 (EDN1) şi receptorul său tip A, precum şi neuropilina 1. Dezvoltarea arcului aortic IV care va conduce la formarea crosei aortice se află sub controlul factorilor de transcripţie MFH1 şi PAX3 şi a receptorilor pentru acidul retinoic, în timp ce factorul de transcripţie TFAP2B controlează dezvoltarea arcului aortic VI care da naştere canalului arterial.

Formarea cordului se termină la sfârşitul săptămânii a zecea.

Caseta 14.3.

Sindroame genetice asociate cu malformaţii cardiace

Sindromul DiGeorge sau velocardiofacial (OMIM 188400) este determinat de o microdeleţie de 3 Mb în regiunea 22q11. Aceasta produce anomalii de dezvoltare ale crestei neurale, care determină defecte conotruncale şi ale arcului aortic, despicătură palatină, hipoplazia timusului şi glandelor paratiroide. Este foarte probabil ca una dintre cele aproximativ 30 de gene prezente în acestă regiune să fie implicată în controlul dezvoltării crestei neurale.

Multe forme familiale de defecte septale atriale şi tulburări de conducere (OMIM 108900) au fost identificate ca fiind determinate de mutaţii ale genei NKX2E. Mutaţii sporadice ale NKX2E au fost identificate de asemeni la pacienţi cu tetralogie Fallot sau anomalii ale valvei tricuspide. Asocierea unor mutaţii specifice care determină pierderea funcţiei ale NKX2E cu anumite anomalii cardiace sugerează intervenţia unor domenii funcţionale diferite ale proteinei în diverse procese din cursul dezvoltării cordului.

Sindromul Holt-Oram (OMIM 142900) este caracterizat prin defecte septale atriale sau ventriculare asociate cu anomalii ale membrelor şi este determinat de mutaţii ale genei TBX5. Mutaţiile responsabile pentru producerea DSA şi DSV sunt grupate în regiuni diferite ale genei, ceea ce sugerează asocierea în aval a unor cofactori diferiţi, cu specificitate tisulară.

Sindromul Alagille (OMIM 118450) este o boală autosomal dominantă caracterizată prin atrezie biliară şi anomalii cardiace, tipice fiind stenoza arterei pulmonare şi tetralogia Fallot. Boală este determinată de mutaţii ale genei JAG1 (Jagged-1), un ligand pentru receptorul Notch. Forme izolate de stenoză pulmonară sau tetralogie Fallot au fost asociate de asemeni cu mutaţii ale JAG1.

Sindromul Char (OMIM 169100) este o boală autosomal dominantă caracterizată prin persistenţa canalului arterial, anomalii ale mâinilor şi dismorfism facial. Este produs de mutaţii dominant negative ale genei pentru factorul de transcripţie TFAP2B, exprimat în celulele crestei neurale.

Analiza familiilor cu stenoza aortică supravalvulară (OMIM 185500) şi sindrom Marfan (OMIM 154700), ambele boli autosomal dominate, au uşurat înţelegerea bolilor aortice. Ambele sunt determinate prin mutaţii ale unor proteine structurale de la nivelul ţesutului conjunctiv. Stenoza aortică supravalvulară, care este o caracteristică a sindromului Williams (OMIM 194050), este determinată de mutaţii ale elastinei, în timp ce sindromul Marfan, caracterizat prin dilatarea anevrismală a aortei ascendente, este determinat de mutaţii ale fibrilinei 1.

b. Dezvoltarea membrelor.

Anomaliile membrelor sunt pe locul doi ca frecvenţă după anomaliile cardiace. Studiul sindroamelor care asociază anomalii de dezvoltare ale membrelor, ca şi posibilităţile mai facile de studiu experimental au permis identificarea a numeroase gene care controlează dezvoltarea membrelor (caseta 14.4).

Originea membrelor este la nivelul unor muguri care iau naştere în mezodermul plăcii laterale şi mezodermul somitic şi care sunt acoperiţi de ectoderm. Aceşti muguri cresc către exterior şi îşi modifică forma iar celulele care îi alcătuiesc vor da naştere la diferitele ţesuturi componente într-o secvenţă care evoluează în direcţie proximo-distală.

Aspectul fundamental în cadrul dezvoltării membrelor este informarea celulelor mugurilor de origine asupra *poziţiei* lor de-a lungul celor trei axe şi apoi interpretarea acestei informaţii în scopul de a da naştere structurilor corespunzătoare. Există trei regiuni (figura 14.8) care sunt implicate în semnalizarea poziţiei celulare: *creasta ectodermală apicală* mediază creşterea mugurilor membrelor de-a lungul axei proximo-distale, *ectodermul dorsal* guvernează modelarea dorso-ventrală a membrelor, în timp ce aşa-numita *regiune de polarizare a activităţii* controlează dezvoltarea antero-posterioară. Fiecare dintre aceste regiuni îşi mediază efectul prin intermediul unor clase de molecule de semnalizare.

- Astfel, creasta ectodermală apicală exprimă intens proteine din familia factorilor de creştere fibroblastică: FGF8 şi FGF10 sunt exprimate precoce la acest nivel, în timp ce FGF2, FGF4 şi FGF9 sunt exprimate mai târziu şi doar în porţiunea posterioară a crestei, numită şi *zona de progresie*. De asemeni are loc expresia

receptorilor tip 1, 2 şi 3 pentru acesti factori. Mutaţiile lor sunt implicate în producerea unor sindroame cu anomalii de dezvoltare a membrelor (vezi caseta 14.3).

- Anterior de diferenţierea crestei ectodermale apicale, ectodermul dorsal exprimă intens proteina WNT7A care este responsabilă de dorsalizarea mezodermului vecin.
- Principalele componente ale căilor de semnalizare asociate regiunii de polarizare a activităţii sunt acidul retinoic, proteina SHH (*Sonic hedgehog*) şi proteine din familia BMP, în particular BMP2.

Toate aceste componente ale căilor de semnalizare sunt coordonate între ele, astfel încât asigură dezvoltarea corectă a segmentelor membrelor de-a lungul celor trei axe. Ca urmare a acestor semnale de poziţionare este indusă expresia spaţială şi temporală caracteristică a unor gene care sunt responsabile de dezvoltarea propriu-zisă a diferitelor structuri ale membrelor. Cei mai importanţi mediatori sunt gene din familiile HOX, SALL, LMX şi TBX, toate codificând factori de transcripţie. Mutaţiile acestor gene au fost descrise în diverse sindroame asociate cu anomalii de dezvoltare ale membrelor.

Astfel, genele HOXA9 – HOXA13 şi HOXD9 – HOXD13 sunt exprimate în domenii suprapuse la nivelul mugurilor membrelor, genele din poziţia 5' (vezi specificarea axei antero-posterioare) fiind exprimate mai târziu şi mai distal. Genele din familia SALL par a fi implicate specific în modelarea degetelor. LMX1 este exprimată în mezenchimul dorsal, în timp ce genele din familia TBX par a fi implicate în modelarea dezvoltării antero-posterioare. Diferenţierea între membrele superioare şi inferioare este controlată prin intermediul unor gene precum cele din familia TBX: TBX5 este exprimată specific la nivelul membrelor superioare, în timp ce TBX4 este exprimată la nivelul membrelor inferioare. O problemă importantă este şi diferenţierea ţesuturilor componente ale membrelor. O prima informaţie asupra mecanismelor implicate este expresia specifică a genei homeobox MEOX2 la nivelul celulelor care vor da naştere muşchilor membrelor.

Caseta 14.4

Cauze genetice ale anomaliilor membrelor la om

Acondroplazia (OMIM 100800) este o boală caracterizată prin hipostatură disproporţionată şi macrocefalie. Majoritatea pacienţilor prezintă o substituţie glicina-arginină la nivelul domeniului transmembranar al FGFR3. Mutaţiile FGFR1 şi FGFR2 sunt implicate de asemeni în producerea sindroamelor Pfeiffer (OMIM 101600: hipertrofia primului deget, hipertelorism), Apert (OMIM 101200: fuziuni ale degetelor, hipoplazia etajului mijlociu al feţei) şi Jackson-Weiss (OMIM 123150: hipoplazia etajului mijlociu al feţei, anomalii ale piciorului).

Mutaţiile GLI3, care codifică un factor de transcripţie cu degete de zinc (identificată a fi gena ţintă a căii de semnalizare Hedgehog) sunt implicate în producerea sindroamelor Greig (OMIM 175700: anomalii craniene şi sindactilie) şi Pallister-Hall (OMIM 146510: asocierea hamartoblastoame hipotalamice, hipopituitarism, imperforatie anală şi polidactilie postaxială)

Mutaţiile genei HOXA13 sunt implicate în producerea sindromului mana-picior-organe genitale (OMIM 140000) caracterizat prin mâini şi picioare scurte cu scurtarea primului metacarpian şi metatarsian, clinodactilia degetului 5 şi fuziuni ale unor oase metacarpiene, la care se adaugă la femei anomalii ale organelor genitale precum sept longitudinal vaginal sau uter bicorn. Mutaţiile HOXD13 sunt implicate în producerea sindactiliei tip II (OMIM 186000), boală în care heterozigoţii prezintă fuziuni ale falangelor şi degete supranumerare. Formele homozigote de boală sunt mult mai severe şi asociază malformaţii osoase mai importante ale mâinilor şi picioarelor. Mutaţia cauzatoare a sindactiliei este o expansiune a unui tract polialaninic din domeniul amino-terminal al proteinei. Proteina normală conţine 15 alanine, în timp ce forma mutantă conţine 22 până la 24 de alanine.

Sindromul Townes-Brockes (OMIM 107480) asociază anomalii ale mâinilor şi picioarelor (deget mare trifalangian şi alte anomalii osoase), anus imperforat, anomalii ale urechilor şi surditate neurosenzorială moderată. Boală este determinată de mutaţii ale genei care codifică factorul de transcripţie SALL1.

Sindromul unghii-rotulă (OMIM 161200) asociază displazia sau absenţa unghiilor cu hipoplazia rotuliană la care se poate adaugă uneori nefropatie. Boală este determinată de mutaţii ale genei LIMX1B.

Defecte ale elementelor anterioare şi posterioare ale membrelor superioare apar în sindromul Holt-Oram (OMIM142900) şi respectiv sindromul mamaro-ulnar (OMIM 181450). Sindromul Holt-Oram este determinat de mutaţii ale genei TBX5, în timp ce sindromul mamaro-ulnar este rezultatul mutaţiilor genei TBX3, care este strâns înlănţuită şi puternic înrudită cu gena TBX5.

3. ROLUL APOPTOZEI ÎN DEZVOLTARE

Termenul *apoptoză* a fost introdus de Kerr şi colaboratorii săi în 1980 pentru a defini ansamblul fenomenelor asociate specific cu procesul *morţii celulare programate* (MCP), adică al morţii survenită în urma *activării autonome*, condiţionată exclusiv temporal, a unui *program de autodistrugere* existent în genomul fiecărei celule. MCP reprezintă modalitatea eliminării populaţiilor celulare din alcătuirea unor structuri embriofetale precursoare care, după ce şi-au încheiat misiunea, urmează a nu mai fi incluse în formaţiunile din care au făcut parte.

Exemple ilustrative sunt rezorbţia membranelor interdigitale, sculptarea cavităţilor, eliminarea organelor şi ţesuturilor tranzitorii (vestigiile filogenetice – pronefros, mezonefros), remodelarea tisulară, distrugerea neuronilor care, din cauza numărului lor excesiv, nu reuşesc să stabilească conexiuni sinaptice.

La adult, apoptoza este esenţială pentru menţinerea homeostaziei mitotice şi pentru păstrarea integrităţii organismului. Prin apoptoză mor celulele infectate cu virusuri, cele al căror genom a suferit leziuni produse de agenţi injurianţi ambientali: radiaţii ultraviolete şi ionizante, substanţe chimice; celulele T autoreactive dotate cu potenţialul de a ataca propriile structuri sunt omorâte apoptotic la încheierea răspunsului imun.

În prezent se acceptă, prin consens, că MCP este orice formă de moarte care nu se datorează unor cauze accidentale sau, mai exact, care nu reprezintă rezultatul intervenţiei intempestive şi brutale a unor agenţi din afara organismului. MCP se asociază cu o cascadă de evenimente morfologice şi biochimice caracteristice, care se succed într-o ordine bine determinată. Succesiunea evenimentelor care definesc apoptoza este cu totul diferită de cea care corespunde morţii traumatice – *necroza* (vezi tabelul 14.2).

Tabelul 14.2. Principalele caracteristici ale necrozei şi apoptozei

Caracteristici	Necroză	Apoptoză
Tipul de moarte	Catastrofică	Programată
Cerinţe de energie	Proces pasiv; nu necesită energie	Proces activ realizat cu consum de ATP
Modificarea volumului celular	Creştere	Scădere
Modificarea densităţii celulare	Scădere	Creştere
Liza membranei plasmatice	În etapa iniţială	În etapa finală
Hidroliza ADN	În etapa finală	Curând după iniţierea procesului
Desfăşurarea procesului	Rapidă	Lentă
Modificarea organitelor celulare	Liză	Compactare
Cicatrizare	Cicatrice fibroasă	Fără cicatrice
Factori inductori	Tulburări nefiziologice: toxine, hipoxie, traumatisme, insultă tisulară masivă	Stimuli fiziologici: lipsa factorilor de creştere, semnale extracelulare.
Celule afectate	Grupuri de celule contigue, ţesuturi în totalitatea lor	Celule individuale
Aspectul ADN	Fragmente ADN de dimensiuni variate	Fragmente ADN reprezentate de multipli de 200pb
Celulele care fagocitează	Macrofage	Celule adiacente sau macrofage

3.1. DESFĂŞURAREA PROCESULUI DE APOPTOZĂ

Apoptoza este un proces activ prin care sunt eliminate celule individuale, dispersate în întreaga masă a ţesuturilor şi organelor. Procesul se desfăşoară în mai multe etape (figura 14.9):

- Într-o primă etapă celulele destinate să moară îşi pierd contactul cu vecinele lor; zonele specializate ale membranelor plasmatice (complexe funcţionale, microvili) dispar, iar organitele citoplasmatice se compactează, păstrându-şi însă integritatea structurală; volumul celulelor se reduce ca urmare a pierderii apei, în condiţiile în care permeabilitatea plasmalemei rămâne, totuşi, nemodificată (celulele sunt capabile să excludă coloranţi vitali). Densitatea de plutire a celulelor este crescută, fapt căruia i se datorează posibilitatea separării prin centrifugare a celulelor apoptotice. În această etapă se produce şi deplasarea, de pe faţa internă a plasmalemei pe cea externă, a unor molecule lipidice – fosfatidil-serină – încărcate negativ, ce vor servi că *markeri ai iniţierii apoptozei*. Celula apoptotică va fi astfel *recunoscută* de vecinele lor care se vor pregăti să o fagociteze şi să o digere;
- În etapa următoare, pe suprafaţa celulelor apar numeroase pliuri şi circumvoluţii care includ porţiuni dilatate ale cisternelor aparatului Golgi şi ale reticulului endoplasmatic neted. Fuziunea dilataţiilor cu membrana plasmatică creează o serie de cavităţi asemănătoare unor cratere. În paralel se produc cele mai reprezentative alterări asociate cu apoptoza, şi anume cele de la *nivelul nucleului*. *Cromatina se condensează* în mase granulare mari, dispuse pe faţa internă a învelişului nuclear. De reţinut că în nucleii celulelor angajate în procesul apoptozei se produce o *fragmentare intensa a moleculelor de ADN* la nivelul filamentelor internucleosomale. În consecinţă, lungimea minimă a fragmentelor va fi egală cu *180-200 nucleotide*. Fragmentele mai lungi sunt alcătuite din multipli ai acestor numere. Separate elecroforetic în gel de poliacrilamidă, fragmentele – datorită diferenţelor de lungime – se dispun într-o coloană al cărei aspect scalariform (*ladder*) este specific apoptozei.
  - Următoarea etapă debutează cu *fragmentarea nucleilor*. La scurt timp celulele se clivează în *corpi apoptotici* alcătuiţi din resturi nucleare şi organite citoplasmatice, puternic condensate, înconjurate de un înveliş membranar;
  - Etapa finală o constituie *fagocitarea corpilor apoptotici* de către macrofagele profesioniste sau de către celulele adiacente; *degradarea* completă a corpilor apoptotici sub acţiunea enzimelor lizozomale ale celulelor care i-au fagocitat durează câteva ore.

Definitorie pentru apoptoză este menţinerea – până în stadiul final al procesului – a integrităţii structurale şi funcţionale a citomembranelor, condiţie obligatorie a prevenirii lezării celulelor vecine de către enzimele hidrolitice conţinute în lizozomii corpilor apoptotici. Se explică astfel lipsa răspunsului inflamator, prezervarea arhitecturii ţesutului şi vindecarea necicatricială.

3.2. GENELE APOPTOZEI ŞI PRODUŞII LOR PROTEICI

Primele informaţii referitoare la controlul genetic al apoptozei au fost furnizate de cercetările întreprinse pe viermele nematod *Coenorhabditis elegans*. Dintre genele implicate în apoptoză la *C. elegans,* două participă direct la traducerea în fapt a deciziei sinuciderii: *ced-3* şi *ced-4* (ced – *cell death defective or abnormal*). Mutaţiile inactivatoare ale acestor două gene suprimă apoptoza şi conduc la acumularea unui număr excesiv de celule. Acţiunea "ucigaşă" a genelor *ced-3* şi *ced-4* este antagonizată de gena *ced-9*, al cărei rol este acela de a proteja celulele de moartea programată.

Ulterior s-a constatat că moartea programată a celulelor umane este rezultatul intervenţiei succesive şi coordonate a unui număr de *proteaze* – în mare măsură similare cu produşii genelor *ced* ale *C. elegans* - şi ale căror trăsături unificatoare le reprezintă existenţa cisteinei în situsurile lor active şi specificitatea acţiunii proteolitice exercitate exclusiv la nivelul reziduurilor aspartat ale proteinelor-ţintă. Acestor trăsături li se datorează denumirea de **caspaze** (cysteinyl-aspartic – acid – proteases) care le-a fost atribuită.

Caspazele umane – în număr de 14 – sunt amplu exprimate în toate tipurile celulare, în care se află sub formă de precursori latenţi (procaspaze). Proenzimele inactive sunt alcătuite dintr-un prodomeniu situat la capătul N-terminal, o subunitate mare (~ 20 kD) şi una mică (~ 10 kD). După clivare, prodomeniul se elimină, iar subunităţile se heterodimerizează.

Familia caspazelor se împarte în două *subgrupuri*: unul care procesează citokinele, şi altul implicat în apoptoză. Primul este alcătuit din caspazele 1, 4, 5, 11, 14. Al doilea include caspazele cu rol de *iniţiato*r (2, 8, 10) şi pe cele cu rol de *efector* (3,6,7). Iniţiatorii au prodomenii

N-terminale lungi, care se pot cupla, prin intermediul unor molecule-adaptor, cu receptorii de suprafaţă – ceea ce le permite să răspundă la stimulii tanatogeni proveniţi din afara celulei.

Activarea caspazelor se realizează pe două căi: *extrinsecă* şi *intrinsecă*.

Calea extrinsecă comportă activarea *caspazei 8* (şi, posibil, 10). Această cale este mediată de receptorii familiei TNF (tumor necrosis factor) şi NGF (neuronal growth factor). Familia mai include şi receptorii CD95 (FAS, APO1), TNFR1, DR3 (APO3). După cuplarea cu ligandul, receptorii se trimerizează şi recrutează proteine adaptor (FADDD – *Fas receptor associated with death domain*) împreună cu care determină clivarea procaspazei 8. Aceasta va activa efectorii apoptotici (caspazele 3 şi 7), iniţiind apoptoza.

Calea intrinsecă implică eliberarea din mitocondrii a citocromului c şi a AIF (*apoptosis inducing factor*), provocată de semnale tanatogene, similare sau diferite de cele primite de receptorii Fas/TNF. Efluxul de citocrom c este mediat de BAX, o proteină formatoare de canale în membranele mitocondriale. Citocromul c citosolic se cuplează cu APAF1 (*apoptotic protease activating factor*), şi determină – în prezenţa ATP – activarea procaspazei 9. Formarea complexului activ – **apoptozomul** (citocrom c, APAF1, caspaza 9) – reprezintă evenimentul declanşator al cascadei caspazelor, care se va amplifica rapid clivând variate substraturi enzimatice şi structurale şi realizând astfel dezasamblarea sistematică şi ordonată a celulelor muribunde. Câteva dintre caspazele umane sunt prezentate în tabelul 14.3.

Tabelul 14.3. Exemple de caspaze umane

Caspaza	Substraturi	Localizarea genei
Caspaza 1	Pro-IL 1	
Caspaza 3	PARP, U1 70kD, protein kinaza c, hungtintina, RB	4q33
Caspaza 8	Toate celelalte procaspaze	2q33
Caspaza 9	PARP, procaspaza 3	?
Caspaza 10	Toate celelalte procaspaze	2q33

O altă cale de autodistrugere, utilizată în special de neuroni, este cea care nu recurge la activarea caspazelor, ci la eliberarea - în momentul recepţionării semnalului tanatogen – a unei proteine situată în spaţiul intermembranar al mitocondriilor, denumită factorul inductor al apoptozei (AIF). Proteina AIF migrează în nucleu, unde se leagă la moleculele ADN cărora le produce rupturi bicatenare, incompatibile cu viaţa.

*Ţintele caspazelor***,** al căror număr este mai mare de 100, sunt extrem de variate:

- constituenţi ai învelişului nuclear (lamina),
- proteine care intră în alcătuirea citoscheletului (gelsolina, fodrina, actina),
- enzime implicate în perceperea şi repararea leziunilor ADN,
- poli(ADP-riboza) polimeraza – PARP,
- protein kinaza dependentă de ADN (DNA-PK),
- ribonucleoproteina U1,
- factorul DFF (*DNA fragmentation factor*) care mediază clivarea internucleozomală a ADN.

Ca urmare a acţiunii caspazelor, celulele muribunde se detaşează de vecinele lor, se sfericizează, ceea ce le facilitează ingestia de către macrofage.

3.3. REGLATORI AI APOPTOZEI

Modularea răspunsului celular la semnalele tanatogene extrinseci sau intrinseci comportă exprimarea diferenţială şi interacţiunea complexă a unor gene aflate în relaţii de antagonism: unele conferă rezistenţă, în timp ce altele cresc susceptibilitatea la apoptoză. În prezent se cunosc 18 gene cu rol pozitiv sau negativ în reglarea programului morţii apoptotice a celulelor umane. Ele aparţin **familiei BCL2** şi se împart, în funcţie de structura şi rolurile pe care le îndeplinesc, în trei subgrupuri, dintre care reprezentative sunt BCL2**,** BCLXL, cu rol antiapoptotic, BAX **şi** BAK stimulatori ai apoptozei; acceleratori ai apoptozei sunt, de asemenea, BID şi BAD**.**

Protooncogena BCL2 a fost identificată prin clonarea şi analiza regiunii cromosomice 18q21, implicată în

translocaţia t(14;18). Această translocaţie, prezentă în 85% din limfoamele foliculare cu celule B, plasează protooncogena BCL2 în proximitatea locusului activator IGH (locusul genei lanţurilor grele ale imunoglobulinelor). În urma translocaţiei, nivelul exprimării genei BCL2 în limfocitele B creşte substanţial. Supraexprimarea genei BCL2 în celulele B foliculare determină capacitatea de a se sustrage controlului mecanismelor inductoare ale apoptozei şi, o dată cu aceasta, rezistenţa sporită la agenţii citotoxici. Consecinţa o reprezintă expansiunea populaţiei de celule B purtătoare ale t(14;18), realizată nu prin intensificarea proliferării, ci pe seama creşterii duratei lor de viaţă.

Alţi membrii ai familiei BCL2 – proteinele BAX, BAK, BAD şi BID – interferează cu BCL2 şi cu BCLXL**,** facilitând iniţierea apoptozei. BAX inactivează BCL2 intervenind astfel în modularea răspunsului apoptotic.

Factorii declanşatori ai apoptozei acţionează din afara sau din interiorul celulei. Factorii externi sunt reprezentaţi de stresul oxidativ exogen; ischemia moderată, excitotoxine (glutamat, fluxuri ionice), carenţa factorilor trofici (reducerea gradului de ocupare a receptorilor), stimuli tanatogeni (TNF-alfa1, corticosteroizi), toxine (beta amiloidul). Factorii interni includ substanţele toxice rezultate din metabolismul celular, formele mutante ale SOD1, semnale celulare, stresul celular, creşterea permeabilităţii membranelor mitocondriale şi efluxul subsecvent de citocrom c, cuplarea liganzilor la receptor, activarea caspazelor, exprimarea genelor tanatogene, depleţia semnalelor pozitive (NGF, interleukina-2), recepţionarea de semnale negative (creşterea nivelului intracelular al oxidanţilor), leziunile produse la nivelul moleculelor ADN.

3.4. APOPTOZA ŞI PATOLOGIA UMANĂ**.**

Diferite boli umane se asociază cu inhibiţia apoptozei sau cu apoptoza excesivă.

- În unele **cancere**, expansiunea populaţiilor celulare maligne se datorează, cel puţin în fazele de început, nu proliferării excesive, ci *prelungirii duratei de viaţă* a elementelor componente, devenite refractare la semnalele apoptotice. Activarea protooncogenei Bcl-2 se produce pe parcursul evoluţiei multora dintre tumorile umane. Alterările genei p53, prezente în 50-65% din cancerele umane, reduc susceptibilitatea la agenţii genotoxici şi abrogă răspunsul apoptotic.
- Înlăturarea limfocitelor potenţial autoreactive şi a surplusului de celule generat în cursul răspunsului imun se realizează prin apoptoză. Dereglările mecanismelor apoptozei şi consecutiva persistenţă în organism a acestor populaţii limfocitare, pot antrena dezvoltarea unor **boli autoimune**.
- Apoptoza reprezintă un mecanism major de apărare a organismului împotriva **infecţiilor virale**. Integrarea proviruşilor în genomul nuclear declanşează semnale apoptotice în urma cărora celulele infectate îşi activează endonucleazele care vor produce, pe lângă clivarea propriului ADN, şi pe cea a ADN viral. Sinucigându-se, celulele infectate împiedică propagarea viruşilor.
- Rata înaltă a pierderii apoptotice a unor seturi specifice de neuroni constituie trăsătura definitorie a unei serii de **boli neurologice**. În **boala Alzheimer**, deperdiţia neuronală a fost considerată a se datora acumulării de beta amiloid cu acţiune proapoptotică. Recent s-a arătat însă că gena stm2 de pe cromozomul 1, înlănţuită cu forma familială a bolii Alzheimer, codifică o proteină care induce apoptoza neuronală indiferent de prezenţa peptidului beta-amiloid. Formele familiale cu debut la vârsta adultă ale **sclerozei laterale amiotrofice** se datorează mutaţiilor genei care codifică Cu-Zn superoxid dismutaza citosolică (SOD1). În condiţiile diminării activităţii SOD1 consecutivă alterării mutaţionale a genei care o codifică, speciile reactive de oxigen vor provoca leziuni ireversibile care, acumulându-se în motoneuroni, îi vor determina şă-şi activeze programul apoptotic. Potrivit unor date foarte recente, în neuronii pacienţilor cu **boală Huntington** sunt prezente formele active ale caspazelor 8 şi 9, precum şi citocrom c citosolic.

Progresele recente în înţelegerea mecanismelor care guvernează moartea celulară programată creează premisele elaborării într-un viitor nu prea îndepărtat a strategiilor terapeutice prin care să se contracareze factorii determinanţi ai inhibiţiei şi excesului apoptozei.

4. SENESCENŢA

Senescenta sau îmbătrânirea este considerată ultima etapă a procesului complex al dezvoltării tuturor organismelor. Senescenţa este un proces inexorabil care se referă la o serie de modificări postmaturaţionale ce determină diminuarea homeostaziei şi creşterea vulnerabilităţii organismului.

In discuţiile despre senescenţă doi parametri importanţi sunt durata medie de viaţă (care se referă la vârstă până la care supravieţuieşte 50% din populaţia studiată) şi potenţialul maxim de supravieţuire (care se referă la durata de viaţă maximă a oricărui membru din acea populaţie sau din cadrul speciei). De-a lungul timpului durata medie de viaţă a crescut continuu, dar, cu toate acestea, potenţialul maxim de supravieţuire rămâne neschimbat. Potenţialul maxim de supravieţuire pare să fie specific fiecarei specii, ceea ce implică intervenţia unei componente genetice importante în controlul ratei de îmbătrânire.

Astfel, studiul fosilelor umane arată că, în urma cu 50000 de ani, oamenii depăşeau rareori vârstă de 40 de ani. Datorită îmbunătăţirii condiţiilor sanitare care au redus marcat morbiditatea, durata medie de viaţă a depăşit 50 de ani către 1900 iar în prezent este în jur de 80 de ani în ţările dezvoltate (70 de ani în România). Femeia cu cea mai îndelungată supravieţuire documentată a fost Jeanne Calment care a murit în Franţa la vârstă de 122 de ani în august 1997. Bărbatul cu cea mai îndelungată supravieţuire documentată a fost Cristian Mortensen care a murit în San Francisco în 1998 la vârstă de 115 ani.

Există mai multe teorii care încearcă să explice mecanismele implicate în procesele de îmbătrânire. Ele pot fi grupate în două mari categorii: teoriile evenimentelor stocastice şi teoriile evoluţionar-genetice. *Teoriile stocastice* consideră senescenţa rezultatul unor alterări întâmplătoare ale unor molecule vitale, precum mutaţiile ADN ori modificările post-translaţionale ale proteinelor. *Teoriile evoluţionar-genetice* consideră senescenţa drept ultima etapă în cadrul unui program continuu de dezvoltare şi maturare care începe în momentul formării zigotului şi se finalizează prin decesul individului. Nici una dintre aceste teorii nu este însă capabilă să explice în întregime complexitatea proceselor care au loc în cursul senescenţei. Cel mai probabil este că evenimentele genetice sunt dominante în cursul fazei iniţiale a vieţii, pentru ca ulterior să domine evenimentele stocastice (figura 14.10).

Din punct de vedere al evoluţiei speciei este necesară asigurarea supravieţuirii până la dobândirea capacităţii reproductive şi, ulterior, a celei de a-şi îngriji urmaşilor, până când aceştia ating la rândul lor capacitatea de a procrea. În acest context există trei categorii de gene care ar putea fi implicate în senescenţă: cele care reglează procesele de reparare la nivel somatic, gene cu pleiotropie antagonistă (care îmbunătăţesc supravieţuirea sau reproducerea în faza iniţială a vieţii, dar au efecte dezavantajoase asupra longevităţii – exemplu genele implicate în sinteza testosteronului) şi gene specifice fiecărei specii asupra cărora acţionează mutaţii ce apar târziu în cursul vieţii şi pentru care există o presiune evolutivă redusă. Pe de altă parte, teoriile stocastice susţin că senescenţa este determinată de acumularea unor leziuni întâmplătoare până la nivele suficiente pentru a determina declinul unor procese fiziologice, caracteristic îmbătrânirii.

4.1. MECANISMELE ÎMBĂTRÂNIRII

Următoarele mecanisme celulare şi moleculare sunt considerate esenţiale în generarea proceselor de îmbătrânire:

- *Scurtarea progresivă a telomerelor,* o dată cu fiecare diviziune, duce la oprirea ciclului celular după un anumit număr de duplicări, ca un mecanism de "numărare" a diviziunile celulare. Scurtarea excesivă poate determina deleţia unor gene esenţiale pentru supravieţuire şi ca urmare atingerea unei dimensiuni critice care nu mai permite ulterior proliferarea şi care

determină moartea celulară (vezi capitolul 5).

- *Mutaţii ale genelor de inactivare a transcripţiei* duc la sinteza unor proteine ce nu se încadrează în economia celulară corespunzătoare acelui moment (sunt sintetizate numai în anumite perioade ale vieţii) sau chiar a unor proteine anormale ce determină pierderea funcţiei celulare.
- *Acumularea mutaţiilor* în molecula ADN fie prin erori de replicare fie prin mutaţii induse, precum şi defectele separării cromosomilor în cursul diviziunii pot duce la oprirea progresiei prin ciclul celular, deci a proliferării.
- *Modificări calitative şi cantitative ale expresiei ADN ribosomal* ce duc la limitarea transcripţiei secvenţelor repetitive ADNr sau la micşorarea secvenţei respective copiate, datorită hiperrecombinărilor declanşate prin mutaţii ale topoizomerazelor sau helicazelor. Consecinţa este scăderea numărului de ribozomi şi implicit a sintezei de proteine urmată de apariţia unui fenotip senescent.

Acumularea mutaţiilor la nivelul ADN. Pe parcursul vieţii se produc numeroase mutaţii la nivel somatic. Aceste mutaţii au surse variate şi sunt reparate prin intervenţia unor mecanisme complexe (vezi capitolul 6). O parte dintre aceste mutaţii rămân însă nereparate, iar acumularea lor progresivă poate atinge un "prag" care corespunde apariţiei modificărilor morfo-funcţionale caracteristice senescenţei. În plus, este posibil ca însăşi mecanismele de reparare ale leziunilor ADN să sufere un declin treptat, o dată cu îmbătrânirea.

O dimensiune cu totul particulară o prezintă *acumularea mutaţiilor la nivelul ADNmt*. Principala sursă a mutaţiilor la acest nivel sunt speciile reactive de oxigen care apar în cursul metabolismului aerob (radicalul superoxid, peroxidul de hidrogen şi radicalul hidroxil). Mutaţiile ADNmt au drept rezultat reducerea treptată a capacităţilor bioenergetice, ceea ce poate conduce eventual la senescenţa şi moarte celulară. Pe de altă parte, restricţia calorică sau o serie de agenţi care reduc stress-ul oxidativ, precum coenzima Q10, tocoferolul, nicotinamida sau acidul ascorbic s-au dovedit în unele studii epidemiologice a avea efecte benefice asupra longevităţii. Există numeroase dovezi care atestă acumularea exponenţială, în paralel cu înaintarea în vârstă, a mutaţiilor ADNmt induse de radicalii liberi de oxigen, în special la nivelul muşchilor scheletici, cordului şi creierului. Asemenea mutaţii par să aibă un rol important în patogenia unor boli asociate senescenţei, cum sunt precum boala Alzheimer, boala Parkinson ori coreea Huntington, precum şi în numeroase miopatii scheletice şi cardiace.

Există unele date care atestă existenţa unei asocieri între anumite variante ale ADNmt şi longevitate. Astfel, aşa-numitul haplotip "J" a fost găsit într-un procent semnificativ mai mare la centenarieni decât la subiecţii tineri. Acelaşi haplotip mitocondrial pare însă paradoxal a fi asociat şi unor boli multifactoriale, ceea ce duce la ipoteza efectului pleiotropic antagonist al unor gene care exercita efecte defavorabile la indivizii tineri dar asigură o mai bună sănătate la vârste înaintate. Data fiind transmiterea exclusiv maternă a ADNmt, în prezent se derulează studii care testează ipoteza determinismului matern al longevităţii.

4.2. GENE ALE LONGEVITĂŢII

Aşa cum am precizat deja, există dovezi numeroase că durata maximă de supravieţuire a fiecărei specii este sub control genetic. Cu toate acestea, heritabilitatea nu depăşeşte probabil 35%. În pofida acestei ponderi relativ reduse, o serie de mutaţii genetice pot afecta însă dramatic procesul de senescenţă. Studiile efectuate pe organisme inferioare au permis identificarea unor asemenea gene ale longevităţii. Ele acţionează pe diferite căi, precum modularea răspunsului la stres, a statusului nutriţional, creşterea capacităţii metabolice sau atenuarea genelor care promovează îmbătrânirea. Mutaţii experimentale ale unor asemenea gene au permis modificarea considerabilă a duratei de viaţă la aceste specii.

Studiile efectuate la mamifere au permis identificarea unor gene ale sistemului imunitar sau care reglează dezvoltarea glandei hipofizare drept determinanţi ai longevităţii. În plus, o serie

de studii epidemiologice la om au permis asocierea unor variante alelice ale unor gene cu prelungirea supravieţuirii. Printre acestea se numără alela epsilon 2 a apolipoproteinei E sau alela D (deletie) a genei pentru enzima de conversie a angiotensinogenului care au fost găsite mult mai frecvent la centenarieni. O altă dovadă pentru contribuţia genetică în determinismul longevităţii o constituie asocierea familială a indivizilor cu supravieţuire îndelungată. Studiile de înlănţuire în asemenea familii au permis identificarea unui locus la nivelul cromosomului 4 care este ascociat în longevitatea excepţională.

Deşi nu există nici o boală genetică care să reprezinte o fenocopie exactă a îmbătrânirii normale, sunt cunoscute câteva sindroame precum Hutchinson-Gilford (progeria "clasică" sau "a copilului"), sindromul Werner (progeria "adultului") ori sindromul Down (trisomia 21) care prezintă unele caracteristici de îmbătrânire accelerată (vezi caseta 14.5).

Caseta 14.5.

Sindroame genetice cu îmbătrânire accelerată

Sindromul Hutchinson-Gilford *(OMIM 176670) este o afecţiune extrem de rară, transmisă autosomal recesiv, în care manifestările caracteristice îmbătrânirii precoce încep să se dezvolte la câţiva ani de la naştere. Acestea includ ridarea tegumentelor, tulburări de creştere şi ateroscleroza avansată, care determină adeseori decesul prin infarct miocardic în jurul vârstei de 30 de ani. Recent, mutaţii punctiforme ale laminei A, o proteina localizată la nivelul membranei nucleare interne, au fost evidenţiate drept cauză a bolii.*

Sindromul Werner *(OMIM 277700) este o afecţiune transmisă autosomal recesiv în care pacienţii dezvoltă prematur ateroscleroza, cataractă, intoleranţa la glucoză, osteoporoză, încărunţire precoce, calviţie, atrofie cutanată şi menopauza. Cu toate acestea ei nu suferă deobicei de boală Alzheimer sau de hipertensiune arterială. Pacienţii au de asemeni un risc crescut pentru dezvoltarea tumorilor sarcomatoase şi dezvoltă cataracta pe suprafaţa posterioară a cristalinului şi nu la nivelul nucleului pulpos, cum se întâlneşte în mod normal la vârstnici. Se asociază şi atrofie laringiană şi ulceraţii ale tegumentelor la nivelul antebratelor şi picioarelor. Majoritatea pacienţilor decedează înaintea vârstei de 50 de ani. Gena responsabilă de producerea sindromului Werner a fost localizată la nivelul cromosomului 8p11-12 şi pare a fi o helicază implicata în replicarea şi repararea ADN. Celulele pacienţilor cu sindrom Werner prezintă instabilitate cromosomică şi rate crescute ale mutaţiilor genice şi ale recombinărilor cromosomice nonhomologe.*

4.3. CONTROLUL SENESCENŢEI CELULARE.

Conceptul de senescenţă celulară a fost fundamentat prin studiile lui Hayflick (1965) pe culturi de fibroblaşti umani. El a observat că după o perioadă iniţială de proliferare intensă urmează invariabil un declin al capacităţilor de creştere şi proliferare şi în final o pierdere completă a acestora. Ca urmare autorul a propus un model conform căruia senescenţa este un fenomen ce are loc nu numai la nivelul întregului organism, ci şi la nivelul fiecărei celule componente; pierderea capacităţilor funcţionale ale individului în cursul îmbătrânirii ar reprezenta suma unor asemenea modificări critice ale celulelor individuale. Este însă important de precizat că celulele senescente, incapabile de replicare, nu mor în mod necesar, ci pot fi menţinute în cultură perioade îndelungate de ani de zile. Numărul diviziunilor celulare pare să fie fix şi independent de condiţiile de cultură şi de timpul scurs. Ca urmare, celulele par să aibă un mecanism intrinsec capabil să "numere" diviziunile pe care acestea le suferă.

Acest mecanism de "numărare" a diviziunile celulare pare să fie strâns corelat cu fenomenul de scurtare a telomerelor cromosomilor (vezi capitolul 5). Odată cu fiecare diviziune celulară, telomerele celulelor care nu au activa telomeraza se scurtează progresiv până la

atingerea unei dimensiuni critice care nu mai permite ulterior proliferarea celulară. Un rol important în controlul senescenţei celulare îl au de asemeni unele gene implicate şi în controlul desfăşurării ciclului celular precum TP53 şi RB.

Apoptoza şi senescenţa.

În prim-planul aspectelor biologice ale îmbătrânirii se situează depopularea progresivă a ţesuturilor şi organelor, evidentă cu precădere la nivelul pielii, muşchilor, oaselor şi sistemului nervos central. La scăderea densităţii celulare a ţesuturilor în reînnoire continuă (epiteliile cutanate şi ale tubului digesctiv, ţesuturi hematoformatoare) sau ocazională (epiteliul hepatic, renal) contribuie atât declinul activităţii proliferative, cât şi pierderile excesive datorate creşterii ratei apoptozei. De rarefierea organelor alcătuite din celule lipsite de competenţă replicativă (sistem nervos, miocard, muşchi scheletici) se fac răspunzătoare exclusiv pierderile prin apoptoză.

Cauzele activării programului apoptotic în celulele organismelor senescente sunt multiple. În vederea sistematizării lor este operaţional ca apoptoza să fie clasificată în normală, abuzivă şi aberantă**.**

Apoptoza normală înlătură celulele devenite disfuncţionale sau potenţial nocive datorită leziunilor ADN pe care le-au acumulat în cursul vieţii. Leziunile rezultă din interacţiunea cu agenţii genotoxici prezenţi în mediul extern şi intern, şi la care celulele sunt expuse permanent dar, mai ales, din erorile inerente desfăşurării proceselor de replicare, recombinare şi reparare a ADN. În acest context este necesar să se insiste asupra faptului că nici unul dintre aceste procese nu este exceptat de greşeli. Ca urmare, în genom se acumulează leziuni spontane într-un număr care îl depăşeşte de câteva ori pe cel al leziunilor induse de factorii ambientali. Dacă rămân nereparate, aceste leziuni determină eliminarea apoptotică a celulelor purtătoare şi implicita depopulare a ţesuturilor. Reparate greşit, ele pot fi convertite în mutaţii, dintre care unele, dotate cu potenţial transformant, vor iniţia dezvoltarea tumorilor.

Apoptoza abuzivă este termenul utilizat pentru a defini modalitatea eliminării din populaţia globală a unor cohorte din ce în ce mai numeroase de celule normale cărora organismul senescent nu le mai poate asigura necesarul de factori de creştere şi supravieţuire. În condiţiile de criză determinate de incapacitatea în continuă accentuare a furnizării unor cantităţi suficiente de factori indispensabili supravieţuirii, unele dintre celulele normale îşi activează programul apoptotic şi mor. Celulele restante vor beneficia astfel de "raţii" suplimentare care le vor permite să-şi desfăşoare, cel puţin pentru un timp, activităţile specifice. Comportamentul "altruist" al celulelor care aleg calea sinuciderii nu este însă de natură să rezolve criza ci, dimpotrivă, contribuie la agravarea ei, deoarece unele dintre aceste celule sunt, ele însele, producătoare de factori de supravieţuire pentru alte tipuri celulare.

Apoptoza abuzivă răspunde, de pildă, de involuţia glandelor mamare şi a uterului, iniţiate în cursul menopauzei ca urmare a diminuării concentraţiei de sexosteroizi. Deficitul de androgeni la bărbaţii vârstnici antrenează moartea apoptotică în diferite ţesuturi, ceea ce explică atrofierea organelor, a pielii şi liza musculară. Declinul care are loc în paralel cu înaintarea în vârstă în sinteza unor factori cu efecte pleiotrope, cum sunt hormonul de creştere şi tipul 1 al factorului de creştere similar insulinei, determină reducerea cantităţii de semnale necesare supravieţuirii şi implicita depopulare prin apotoza abuzivă a majorităţii ţesuturilor.

Apoptoza consecutivă privării de factori trofici se face răspunzătoare de rarefierea progresivă, asociată cu senescenţa, a ţesutului nervos. Supravieţuirea neuronilor este condiţionată de furnizarea continuă a factorilor neurotrofici (NGF), care acţionează suprimând semnalul declanşator al apoptozei. Incapacitatea neuronilor senescenţi de a elabora cantităţi suficiente de NGF va antrena moartea în lanţ a elementelor de la care primesc aferenţe prin intermediul sinapselor. Viabilitatea diferitelor tipuri de celule gliale depinde, la rândul ei, de prezenţa unor factori trofici. Diminuarea, pe măsura înaintării în vârstă, a cantităţii de factori neurotrofici

reprezintă, prin urmare, cauza şi, totodată, efectul depopulării masive a organelor nervoase.

Senescenţa se însoţeşte de alterări ale funcţiilor imunitare exprimate prin scăderea răspunsului imun, pierderea memoriei imunologice şi creşterea toleranţei imunologice. Aceste disfuncţionalităţi au fost atribuite, printre altele, apoptozei excesive a limfocitelor T, consecutivă carenţei în interleukină-2 (IL-2). Deperdiţia, prin apoptoză abuzivă, a limfocitelor T normale limitează posibilitatea organismului îmbătrânit de a răspunde adecvat la stimulii antigenici.

Apoptoza aberantă este rezultatul uzurii pe care o suferă, în timp, diferitele componente ale circuitelor de transducţie a semnalelor extracelulare. Deteriorarea unui releu al acestor circuite poate bloca transmiterea semnalelor de supravieţuire sau poate determina activarea spontană, în lipsa stimulilor apoptotici a programului intrinsec al morţii celulare. Mai mult decât atât, ca urmare a deteriorării releelor, un semnal stimulator al proliferării poate fi convertit în unul tanatogen; faptul este explicabil deoarece transducţia semnalelor proliferării şi apoptozei se realizează pe căi strâns intricate, alcătuite din elemente aflate sub controlul unor aceloraşi gene.

B. ANOMALIILE CONGENITALE

De la concepţie şi până la naştere se pot produce la embrion şi făt diferite defecte morfologice, funcţionale şi biochimice. Ele sunt reunite într-un grup patologic foarte larg denumit **defecte congenitale** (“*birth defects”*). Termenul *congenital* semnifică *“prezent la naştere”* indiferent dacă defectul este vizibil/identificat sau nu în această perioadă (OMS,1972). Categoria defectelor congenitale cuprinde: bolile genetice (inclusiv erorile înăscute de metabolism), anomaliile congenitale (ca defecte morfologice), întârzierea creşterii intrauterine idiopatice, fetopatiile tumorile congenitale, etc.

Anomaliile congenitale sunt modificări *morfologice* (structurale) ale unui organ, parte de organ sau regiune anatomică produse de tulburări de *dezvoltare prenatală* (erori de morfogeneză), *prezente la naştere*, evidente (depistate) sau nu în această perioadă.

Anomaliile congenitale sunt cauze comune de morbiditate şi mortalitate, în special în copilărie. Datorită frecvenţei ridicate (3-5% nou-născuţi), consecinţelor deseori grave şi posibilităţilor reale de profilaxie, *anomaliile congenitale sunt o problemă majoră de sănătate publică*. În acest context este util de precizat că 25% dintre copiii cu anomalii congenitale decedează (majoritatea în primul an de viaţă), un sfert dintre ei vor avea un handicap fizic sau psihic major iar restul (50%) au un prognostic bun după intervenţii chirurgicale „reparatorii”.

Abordarea practică eficace a anomaliilor congenitale implică prevenţia şi diagnosticul lor precoce (prenatal sau neonatal), corect şi complet. Ambele acţiuni necesită însă cunoştinţe etiopatogenice, abilitate clinică şi mijloace adecvate de explorare.

1. CLASIFICAREA ANOMALIILOR CONGENITALE.

1.1 CLASIFICAREA PATOGENICĂ

Anomaliile congenitale se clasifică după *natura erorii de morfogeneză* în patru tipuri: malformaţii, disrupţii, deformaţii şi displazii congenitale (Spranger et al, 1982).

a. Malformaţiile congenitale[5] sunt anomaliile congenitale produse printr-un proces *primar, intrinsec şi precoce* de dezvoltare (morfogeneză) anormală. Organul nu se dezvoltă normal (dar ţesuturile componente sunt normale) fie datorită unei *diferenţieri incomplete*[6]

[5] De remarcat că termenul de “malformaţii congenitale” este mai restrictiv, mai limitat, decât cel de anomalii congenitale.

[6] Morfogeneza incompletă interesează procesele de: *închidere* (despicăturile), *separare* (sindactilia), *septare* (DSA,

(procesul de morfogeneză nu se termină; de exemplu, DSV, sindactilia etc) fie unei *diferenţieri anormale* (morfogeneza decurge anormal; de exemplu, polidactilia).

Malformaţiile congenitale se produc precoce în cursul dezvoltării embrionare (15-60 de zile[7])(*"embrioptii"*) şi pot fi izolate (unice sau complexe) – implicând un singur organ – sau multiple, afectând cel puţin două organe diferite. Foarte rar se produc în perioada fetală (de exemplu, despicăturile palatine) sau perinatală (de exemplu, persistenţa canaluui arterial). În funcţie de consecinţele medicale şi sociale sau cosmetice, malformaţiile pot fi majore (2-3% nou-născuţi) sau minore

b. Disrupţiile congenitale sunt anomaliile congenitale produse prin alterarea sau distrugerea *secundară, extrinsecă şi tardivă* (fetopatii) a unei structuri fetale formată normal. (de exemplu, amputaţiile digitale, atreziile). Procesele distructive produc modificări de formă, configuraţie, diviziuni sau fuziuni neobişnuite, pierderi ale unor părţi componente.

Disrupţiile sunt determinate de agenţi extrinseci – ischemie, infecţii, forţe mecanice (bride amniotice) – care distrug structuri embrionare normale, prin compresie şi/sau necroză (consecutivă unor tromboze, embolii, compresiuni). Prin definiţie o disrupţie nu este genetică deşi uneori factorii genetici pot predispune la evenimente disruptive (de exemplu, defecte ale colagenului care reduc rezistenţa amniosului şi îl fac mai vulnerabil la rupturi spontane).

După naştere este dificil de stabilit dacă o anumită anomalie congenitală este o malformaţie ("primară") sau o disrupţie ("secundară") (de exemplu, cataracta congenitală poate fi o malformaţie produsă de mutaţii diferite sau o disrupţie, produsă de agenţi teratogeni). Deobicei disrupţiile se exprimă prin anomalii congenitale multiple.

c. Deformaţiile congenitale sunt anomalii de formă sau poziţie a unei părţi a corpului produse prin compresia şi deformarea unei regiuni normal formate ca morfologie şi structură (fetopatie). Deformaţiile interesează sistemul musculo-scheletic[8] şi produc pierderea simetriei, alterarea alinierii, distorsionarea configuraţiei, poziţia anormală a unor structuri; sunt determinate de cauze multiple care produc *limitarea spaţiului* uterin şi/sau *inabilitatea de mişcare* (uter mic/ malformat, făt mare sau sarcină gemelară, oligohidramnios). De obicei compresia este *extrinsecă* (de exemplu, picior strâmb prin oligohidramnios) dar mai rar, cauzele pot fi *intrinseci* (imobilitate fetală prin anomalii ale SNC sau boli musculare; de exemplu, picior strâmb prin meningocel); în această situaţie se asociază frecvent dar neobligatoriu cu *artrogripoză*. Spre deosebire de malformaţii şi disrupţii, deformaţiile pot fi reversibile (dacă încetează compresia), spontan sau după manevre ortopedice

d. Displaziile congenitale sunt anomalii congenitale, localizate sau generalizate, determinate de organizarea celulară anormală a unui ţesut (dishistiogeneză). De obicei, efectele displaziei se observă în toate structurile corpului în care se găseşte ţesutul respectiv. De exemplu, displaziile scheletice interesează frecvent toate piesele osoase iar displaziile ectodermale afectează toate ţesuturile de origine ectodermică: piele, păr, unghii, dinţi. Displaziile sunt determinate deobicei de mutaţii monogenice şi au deci un risc mare de recurenţă.

Clasificarea anomaliilor congenitale în una din cele patru categorii patogenice este importantă pentru *evaluarea corectă a prognosticului* (malformaţiile şi disrupţiile sunt ireversibile, se corectează numai chirurgical şi au o mortalitate ridicată; în schimb, majoritatea deformaţiilor sunt reversibile, se corectează spontan) precum şi pentru *stabilirea riscului genetic*

DSV), *migrare* (extrofia de cloacă), *rotaţie* (malrotaţia intestinală), *rezorbţie* (atrezia coanală, diverticulul Mackel). În această categorie se includ şi *agenezia* (absenţa unui mugure embrionar), *aplazia sau hipoplazia* (dezvoltarea / diferenţierea incompletă a unui mugure embrionar)

[7] Pentru cele mai multe structuri organogeneza se încheie la 8 săptămâni după fecundare (excepţie fac creierul, organele genitale externe, dinţii)

[8] Deformaţiile nu implică defecte tisulare dar ţesuturile cu structură anormală sunt mai susceptibile la deformare.

de recurenţă (malformaţiile unice au un risc mic, 3%; disrupţiile sau deformaţiile produse de agenţi externi au un risc practic nul, dacă se corijează cauza; displaziile fiind determinate monogenic, au un risc mare de recurenţă).

Din păcate, nu este întotdeauna posibilă încadrarea unei anomalii congenitale în una din cele patru categorii specifice, acestea putând a avea diferite grade de suprapunere:

- unele anomaliile congenitale pot fi, în funcţie de natura agentului iniţiator, malformaţii sau deformaţii; de exemplu secvenţa Pierre-Robin este malformativă în trisomia 18 şi deformativă, prin compresie mecanică extrinsecă; aplazia radială poate fi o malformaţie (asociată cu anomalii cardiace în cazul sindromului Holt-Oram, produs de mutaţia genei TBX5) sau o disrupţie, cauzată de talidomidă;
- un acelaşi mecanism (de exemplu, ruptura amniotică) poate da anomalii congenitale diferite: malformaţii (despicătură palatină) sau disrupţii (amputaţii digitale) – prin bride amniotice – şi picior strâmb, prin oligohidramnios;
- o malformaţie poate produce secundar deformaţii (de exemplu, meningomielocelul se poate asocia cu piciorul strâmb congenital);

Atunci când nu se poate face distincţia între diferite categorii (de exemplu, între malformaţii şi disrupţii) sau nu se poate stabili exact tipul de anomalie se preferă termenul mai larg de anomalii congenitale.

1.2. CLASIFICAREA CLINICĂ

Clasificarea anomaliilor congenitale după manifestarea clinică este foarte importantă pentru un diagnostic corect şi complet. În funcţie de numărul şi tipul erorilor ce se produc în morfogeneză se deosebesc anomalii congenitale izolate şi multiple.

a. Anomaliile congenitale izolate (simple) se produc printr-o eroare unică şi localizată în morfogeneza unui *câmp (unitate) de dezvoltare embrionară* (monotopic – când generează mai multe structuri adiacente, vecine, sau politopic – când produc structuri multiple situate la distanţă unele de altele). Se împart în două categorii: *defecte de câmp de dezvoltare*[9] şi *secvenţe*.

- *Defectele de câmp monotopic* includ anomaliile congenitale *unice* (o singură manifestare, de exemplu DSV), precum şi anomaliile congenitale *complexe* (mai multe anomalii într-un organ; de exemplu DSA+DSV sau tetralogia Fallot etc.
- *Defectele de câmp politopic* sunt anomalii congenitale multiple ce derivă totuşi dintr-un singur câmp de dezvoltare; de exemplu defectele arcurilor branhiale 1 şi 2 produc sindromul facio-auriculo-vertebral iar defectele arcurilor branhiale 3 şi 4 determină sindromul velo-cardio-facial (ce include şi varianta DiGeorge); alte exemple: holoprosencefalia (vezi caseta 14.1), neurocristopatiile etc.
- *Secvenţele* sunt aparent anomalii congenitale multiple dar în aceste cazuri o anomalie primară determină în cascadă anomalii secundare. Secvenţele pot fi malformative, deformative şi disruptive:

  - *secvenţa malformativă* Pierre-Robin se caracterizează prin hipoplazia mandibulei (micrognaţie) care produce secundar ascensionarea poziţiei limbii, împiedecând închiderea palatului şi producând despicătură palatină şi glosoptoză;

  - *secvenţa deformativă* Potter este determinată de oligohidramniosul produs fie prin pierderea cronică de lichid amniotic, fie printr-o malformaţie urinară; acesta conduce secundar la o compresie fetală – cu dismorfie facială, luxaţie congenitală de şold, picior strâmb congenital –

[9] Trebuie să arătăm că folosirea noţiunii de câmp de dezvoltare, pentru a explica de ce mai multe malformaţii se întâlnesc împreună, este destul de dificilă şi necesită cunoştinţe solide de topografie embrionară; în plus, nu aduce prea multe clarificări patogenice. Pentru practician, termenii de malformaţii unice, complexe şi secvenţe sunt suficient de clari şi utili.

şi hipoplazie pulmonară;
- *secvenţa disruptivă* prin benzi amniotice care produc amputaţii digitale, despicături faciale bizare, encefalocel asimetric etc).

b. Anomaliile congenitale multiple sunt produse prin erori multiple de morfogeneză Se pot împărţi în trei categorii:

- *Sindroamele plurimalformative* grupează mai multe anomalii congenitale majore şi/sau minore *corelate* între ele printr-o etiopatogenie comună. Un sindrom dismorfic sau plurimalformativ este o combinaţie caracteristică de anomalii congenitale majore şi minore observate împreună, într-un mod predictibil, la mai mulţi pacienţi în familii diferite şi, uneori, în aceeaşi familie; ele au foarte probabil o cauză sau un mecanism comun de producere. Pe această bază se deosebesc *sindroame cromosomice* (sindromul Down), *monogenice* (sindromul Marfan), *teratogene* (sindromul alcool fetal); există şi sindroame care pot fi "recunoscute clinic" printr-o combinaţie specifică de semne şi simptome dar care, pentru moment, ramân neelucidate etiopatogenic (sindromul Brachmann de Lange, caracterizat prin hipostatură, micromelie, dismorfie facială caracteristică). Elementele componente ale unui sindrom sunt nespecifice (pot fi prezente şi în alte sindroame şi pot avea cauze diferite) şi rareori una dintre anomalii duce la diagnostic; combinaţia este unică şi nu părţile sale.
- *Asociaţii malformative* în care mai multe malformaţii tind să se întâlnească mai frecvent împreună decât ar rezulta prin „jocul" întâmplării, deci se asociază "nealeatoriu", fără a putea fi (încă) corelate patogenic între ele (precum în cazul sindroamelor). Numele asociaţiilor este adesea un acronim alcătuit prin alăturarea primelor litere ale organelor implicate sau anomaliilor asociate (denumite în limba engleză).
  - Asociaţia VATER reuneşte anomalii Vertebrale, Anale, Traheo-Esofagiene, Renale, – dar rareori sunt prezente toate aceste componente iar uneori se adaugă malformaţii Cardiace, ale membrelor (Limbs) sau arteră ombilicală unică (Single) astfel că acronimul poate deveni VACTERLS.
  - Asociaţia MURCS constă în asocierea neîntâmplătoare a următoarelor anomalii congenitale, denumite în engleză: müllerian ducts aplasia, renal aplasia, cervicothoracic somite dysplasia.
  - Asociaţia CHARGE include următoarele anomalii, denumite în engleză: coloboma, heart disease, atresia choanae, retarded growth and development, genital anomalies.

  Probabil studiile viitoare vor putea identifica o bază comună pentru asocierea malformativă. Delimitarea lor intr-un grup distinct are şi raţiuni practice: identificarea unei (unor) malformaţii caracteristice asocierii implică căutarea prezenţei celorlalte componente malformative.
- *Anomalii congenitale multiple* rezultat al combinaţiei întâmplătoare a unor anomalii cu frecvenţă individuală mare. Dacă nu se poate face un diagnostic specific de sindrom sau asociere, în cazul unui pacient cu anomalii congenitale multiple este util a se folosi, simplu, această denumire (ACM ± retard mintal) în locul termenului de "sindrom plurimalformativ" atât de des uzitat.

1.3. CLASIFICAREA ANOMALIILOR CONGENITALE DUPĂ GRAVITATE

Acest tip de clasificare permite evaluarea corectă a prognosticului şi nivelului îngrijirilor medicale. Se disting: anomalii congenitale *letale* (anencefalia), *majore* (omfalocelul), *medii* (testiculul necoborât) şi *minore* (urechi jos implantate); primele trei categorii mai sunt denumite, împreună, anomalii majore pentru a fi deosebite de anomaliile minore.

a. Anomaliile minore nu au consecinţe medicale sau cosmetice serioase pentru pacient şi pot fi considerate variante populaţionale (etnice), familiale sau individuale ale unui caracter

normal. Sunt numeroase (peste 60) şi 2/3 interesează capul, faţa şi membrele (tabelul 14.4). Sunt frecvente la nou născuţi (circa 15% au o anomalie minoră), mai ales la prematuri sau dismaturi (20-35%). Unele anomalii minore dispar în copilărie, ca urmare a creşterii structurilor.

Prezenţa mai multor anomalii minore poate fi însă un *indicator* preţios al perturbării nespecifice a morfogenezei (inclusiv a SNC, în debilitatea mintală idiopatică) şi impun căutarea atentă a unei malformaţii viscerale majore. De altfel, multe sindroame plurimalformative sunt caracterizate prin *combinaţii specifice* de anomalii minore.

Tabel 14.4. Anomaliile minore

Craniu şi scalp *Vârtej pilar triplu* *Vârtej pilar absent* *Sutură metopică evidentă* *Fontanelă sagitală* *Fontanelă sagitală* *Foramen parietal* *Occiput turtit* *Occiput proeminent* *Bose frontale* *Sprâncene plate* **Urechi** *Tubercul Darwinian* *Unghi Darwinian* *Absenţa plierii helixului* *Conca cu punţi* *Şanţ pe lobul* *Creastă pe lobul* *Urechi "pleoştite"* *Urechi în cupă* *Urechi retroversate* *Helix îngroşat*	*Helix rulat excesiv* *Helix ataşat la scalp* **Sinusuri** *Branhial* *Preauricular* *Pe lobul* *Helical* *Pilonidal* **Faţă şi gât** *Sinofris* *Epicantus* *Iris pestriţ* *Fante palpebrale oblice în sus sau în jos* *Fante palpebrale scurte* *Hipertelorism* *Hipotelorism* *Ptoză* *Rădăcina nasului turtită* *Narine antevertate* *Sept nazal lung* *Filtrum scurt/lung*	*Filtrum neted* *Microstomie* *Macrostomie Despicătură labială – Microformă* *Despicătură gingivală* *Macroglosie* *Microglosie* *Uvulă bifidă* *Creastă alveolară lată* *Micrognatie* *Piele redundantă pe ceafă* *Pterigium coli* **Piele** *Gropiţe pe umăr* *Gropiţe scarate* *Gropiţe pe alte oase* *Pliu palmar unic* *Pliu unic pe degetul V* *Pliu plantar* *Apendici cutanaţi* *Hemangioame*	*Nevi* *Pete hiperpigmentate* *Pete hipopigmentate* **Trunchi** *Mameloane supranumerare* *Arteră ombilicală unică* *Hernie ombilicală* *Diastasis al muşchilor drepţi abdominali* *Hipospadias gandular* *Scrot în şal* *Apendice vaginal* **Membre** *Cubitus valgus* *Degete conice* *Degete încălecate* *Police/haluce lat* *Clinodactilie* *Unghii hipoplazice* *Unghii hiperconvexe* *Spaţii mari între degete la picior* *Calcaneu proeminent*

2. CAUZELE ANOMALIILOR CONGENITALE.

Identificarea etiologiei anomaliilor congenitale este un obiectiv important pentru profilaxie şi sfat genetic. Problema nu este de loc simplă deoarece:

- determinarea cauzelor este dificilă,
- există o *heterogenitate etiologică,*
- o anumită malformaţie congenitală poate avea cauze diferite,
- în circa 50% dintre anomalii congenitale nu se cunoaşte, încă, determinismul cauzal.

Cauzele cunoscute sunt genetice (~45%) şi negenetice (~5%). Rezultă că în mod contrar cu ceea ce se crede public *factorii mediului ambiant au la om o contribuţie mică* la producerea anomaliilor congenitale. Totuşi, cunoaşterea şi identificarea lor are consecinţe practice importante pentru profilaxie.

2.1. CAUZELE NEGENETICE

Un agent extern care produce o anomalie congenitală, prin interferarea dezvoltării embrionare şi fetale este numit *teratogen*. Efectele potenţiale ale oricărui agent teratogen vor depinde de *doză* şi, mai ales, de *timpul* când a fost administrat în cursul sarcinii. Se ştie că fiecare organ are o perioadă critică, de maximă vulnerabilitate, şi că există un veritabil „orar embrionar", ce corespunde perioadei de formare a organelor (figura 14.11). Un alt factor care influenţează acţiunea teratogenilor îl reprezintă *susceptibilitatea* (reactivitatea) genetică a mamei şi/sau

fătului, care explică de ce nu se produc întotdeauna malformaţii după o expunere teratogenă.

Agenţii externi cu risc mare de teratogeneză, cum ar fi talidomida sau virusul rubeolic, pot fi identificaţi uşor. Din nefericire, mulţi teratogeni cu efecte mici sunt mult mai greu de identificat. Iar studiile experimentale pe animale nu pot fi extrapolate la om, deoarece fiecare specie are susceptibilităţi diferite.

a. Agenţii biologici sunt reprezentaţi în special de: virusurile rubeolic, citomegalic, herpetic, varicela; parazitul Toxoplasma gondii şi spirocheta Treponema pallidum. Toţi sunt cert teratogeni dar efectul lor este variabil (tabelul 14.5). Se apreciază că, global, infecţiile sunt responsabile de circa 2% din anomaliile congenitale. Intervenţia unor posibili agenţi infecţioşi în geneza malformaţiilor congenitale se poate explora prin testul TORCH (de la *Toxoplamosis; Other – de ex., sifilis; Rubella; Cytomegalovirus; Herpes*).

Tabelul 14.5. Infecţii cu efecte teratogene certe

Infecţie	Efecte
Rubeola	Microcefalie, cataractă, retinită, malformaţii cardiace
Citomegalovirus	Corioretinită, surditate, microcefalie
Herpes simplex	Microcefalie, microftalmie
Varicela zoster	Microcefalie, malformaţii oculare, digitale, defecte cutanate
Treponema	Hidrocefalie,osteite
Toxoplasmoza	Microcefalie / hidrocefalie, cataractă, corioretinită, surditate

b. Agenţii chimici. Deşi se cunosc peste 50.000 de substanţe chimice, numai 25 s-au dovedit a fi teratogene (tabelul 14.6) la om şi ele produc circa 2% din toate anomaliile congenitale. Dintre drogurile teratogene citäm: alcoolul, anticonvulsivantele (fenitoina, carbamazepina), citostaticele, unele anticoagulante (warfarina), androgenii şi progestinele sintetice, retinoizii, litiul, talidomida etc. Am plasat pe primul loc alcoolul deoarece alcoolismul cronic matern este încă relativ frecvent şi efectele nocive fetale sunt certe (caseta 14.6); după unii autori alcoolismul fetal este una din cauzele majore ale retardului mintal şi ale tulburărilor de comportament. Mai subliniem faptul ca deseori părinţii unui copil cu anomalii congenitale invocă în producerea defectului expuneri din mediul înconjurător dar ei pot fi asiguraţi că numai un singur agent chimic – mercurul metilic – s-a dovedit a fi teratogen.

Tabelul 14.6. Droguri cu efecte teratogene certe

Drog	Efecte
Inhibitori ECA	Disgenezie renală, oligohidramnios, defecte de osificare ale craniului
Alcool	Dismorfie cranio-facială, malformaţii cardiace, microcefalie şi anomalii ale SNC,
Aminopterina	Dismorfie cranio-facială, DTN, craniosinostoză,malformaţii membre
Androgeni/ norprogesteron	Masculinizare organe genitale externe
Carbamazepina	Spina bifida
Diethilstilbestrol	Malformaţii uterine, adenocarcinom vaginal, infertilitate masculină
Fluconazol (doze mari)	Malformaţii craniofaciale , membre

Hidantoina	Malformaţii cardiace si digitale
Litium	Malformaţii cardiace (anomalie Ebstein)
Methotrexat	Craniosinostoză, malformaţii membre
Penicilamina	Cutis laxa
Fenitoina	Malformaţii cardiace, despicătură palatină, hipoplazie digitală
Retinoizi	Hidrocefalie, malformaţii auriculare şi oculare, absenţa timus
Streptomicina	Surditate
Tetraciclina	Hipoplazia emailului dentar
Talidomida	Focomelie şi alte malformaţii membre, malformaţii cardiace
Acidul valproic	DTN, dismorfie cranio-facială
Warfarina	Hipoplazie nazală, epifize punctate

(Surse: Jorde et al, 2000; Wilson, 2000)

c. Agenţii fizici – radiaţiile ionizante, hipertermia prelungită si conformaţia anormală a uterului – pot avea efecte teratogene.

d. Starea mamei – fiziologică (vârsta peste 35 ani, starea de nutriţie, deficitul în folaţi, echilibrul hormonal) sau patologică (diabet zaharat, fenilcetonurie, lupus eritematos sistemic, boală Graves) – este implicată în circa 1% din anomaliile congenitale.

Deşi numărul agenţilor cert teratogeni este redus iar contribuţia lor la producerea unor anomalii congenitale este mică (circa 5%) se recomandă ca orice gravidă să cunoască şi să evite în primele 2-3 luni de sarcină orice factor de mediu – biologic, chimic sau fizic – care ar putea interfera morfogeneza normală. Medicii care evaluează un copil cu anomalii congenitale trebuie să acorde o atenţie specială istoricului gestaţional, mai ales în perioada embrionară de producere a defectului observat la pacient.

Caseta 14.5.

Sindromul alcool-fetal

Unul dintre cei mai frecvenţi teratogeni la om este alcoolul consumul excesiv. Deşi pericolul acestui drog la femeile gravide este cunoscut din antichitate, primul studiu documentat despre alcoolismul fetal apare abia în 1960. Cercetările experimentale pe fetuşi de rozătoare şi primate au demonstrat că alcoolul administrat în cursul sarcinii produce anomalii cerebrale şi microftalmie, a căror gravitate este direct proporţională cu doza şi momentul administrării. La om consumul cronic de alcool poate afecta sever nou-născuţii– sindromul alcoolismului fetal (FAS de la „Fetal Alcohol syndrome") – sau parţial (FAE de la „Fetal Alcohol Effect"), care împreună au o incidenţă de 1-2 la 1000 de nou-născuţi.

FAS se caracterizează printr-o întârziere a creşterii pre- şi postnatale, microcefalie, facies sugestiv (cu fante palpebrale scurte, rădăcina nasului turtită, filtrum neted şi scurt, buza superioară subţire şi anomalii ale urechii). La aceasta se adaugă inconstant malformaţii cardiace, renale, oculare. Cei mai mulţi copii cu FAS au probleme neuro-comportamentale incluzând un deficit mintal uşor sau moderat (QI=40-65), dificultăţi de învăţare, hiperactivitate, impulsivitate, deficite neurosenzoriale.

Diagnosticul neonatal este dificil şi numai 50% din bolnavi sunt diagnosticaţi până la 3-4 ani. Nu există un marker biochimic sau molecular al expunerii prenatale la alcool şi numai istoricul gestaţional ramâne o „şansă" de diagnostic, care se validează în mai puţin de 40% din cazuri; anamneza sarcinii este însă dificlă şi necesită o abilitate deosebită: discuţii cu ambii părinţi, evitarea întrebărilor directe, conturarea contextului socio-economic; mama va fi întrebată succesiv dacă a consumat ape minerale carbonatate, bere şi/sau vin (deseori considerate a nu fi „băuturi") şi dacă a fumat în cursul sarcinii.

Multe probleme legate de folosirea dozelor moderate de alcool în sarcină, predispoziţia genetică la FAS, criteriile comportamentale de diagnostic nu sunt încă soluţionate dar este cert faptul că expunerea la alcool în cursul graviditătii poate fi prevenită

2.2. CAUZELE GENETICE

Cauzele genetice ale anomaliilor congenitale sunt mult mai numeroase (circa 45%) decât cele ecologice şi progresele cunoaşterii mecanismelor de control genetic al embriogenezei (vezi subcapitolul 14.A) vor duce cu certitudine la amplificarea cunoştinţelor în acest domeniu.

- Anomaliile cromosomice neechilibrate (trisomii sau monosomii complete sau parţiale) se întâlnesc la circa 6% din anomaliile congenitale dar foarte probabil aceasta este o subevaluare a fenomenului real determinată de nivelul tehnicilor folosite.
- Mutaţiile monogenice sunt responsabile de aproximativ 7,5% dintre anomaliile congenitale izolate (de exemplu: microcefalia – AR, hidrocefalia prin stenoza apeductului Sylvius – XR; polidactilia sau brahidactilia – AD) sau sindromice [de exemplu, sindromul Apert (craniosinostoză, sindactilie) – AD, sindromul Roberts (focomelie, despicătură labială/palatină)– AR].
- Ereditatea multifactorială este implicată în producerea a 20-30% din anomaliile congenitale, în special formele izolate, "non-sindromice", ale malformaţiilor cardiace (DSA, DSV; persistenţă canal arterial etc), SNC (anencefalie, encefalocel, spina bifida), sistemului genito-urinar (agenezie renală, hipospadias etc) şi altele (despicături labio-maxilo-palatine, LCS etc). Anomaliile congenitale multifactoriale au fost tratate pe larg în capitolul 13.B

Cert este că la orice pacient cu anomalii congenitale trebuie făcută o evaluare atentă şi cât mai completă a cauzelor genetice (anamneză familială, explorări genetice – vezi capitolul 9.A) deoarece numai pe această bază se poate determina riscul genetic de recurenţă.

În circa 50% din toate anomaliile congenitale nu se poate stabili în mod clar o cauză precisă; aceasta nu înseamnă că nu pot fi implicaţi factori genetici, ci numai ca ei nu pot fi identificaţi. Astfel unele malformaţii izolate sau sindroame "neexplicabile" pot fi consecinţa unor mutaţii noi, a microdeleţiilor submicroscopice sau a disomiei uniparentale (vezi capitolele 5.D.3 şi 6.B.3); foarte probabil studiile moleculare vor elucida în curând "enigmele" producerii unui procent mult mai mare de anomalii congenitale. În toate aceste cazuri riscul de recurenţă este însă foarte mic.

3. CONDUITA PRACTICĂ ÎN DIAGNOSTICUL ANOMALIILOR CONGENITALE

Naşterea unui copil cu dismorfii /anomalii congenitale este pentru părinţi un şoc, o dramă. De aceea medicul practician trebuie să dovedească multă compasiune, înţelegere şi disponibilitate; el trebuie să rezolve patru probleme: 1) ce are copilul? (diagnostic clinic); 2) din ce cauză (diagnostic etiologic); 3) ce se poate face pentru pacient (tratament) şi care este prognosticul lui; 4) ce risc există în familie ca la o altă sarcină evenimentul să se repete (sfat genetic). Elucidarea lor presupune un ansamblu de competenţe pe care unii medici de familie sau pediatri nu le au. Prin prioritatea abordării patologiei malformative ei sunt însă obligaţi să deţină informaţiile referitoare la modul general de abordare a celor patru probleme, să le rezolve progresiv în limitele lor de competenţă şi să dirijeze cazurile corect spre alţi specialişti. Fără a diminua importanţa şi sarcinile "medicilor din prima linie" este necesară formarea unor specialişti şi a unor Centre specializate de diagnostic care pot rezolva mai competent problemele de diagnostic şi sfat genetic (toate aceste probleme au fost discutate pe larg în capitolul 9).

Conduita diagnostică se particularizează la fiecare tip de anomalie congenitală dar credem că se pot aplica câteva reguli generale.

1). *Anamneza* (materno-fetală, neonatală şi postnatală, familială) va fi detaliată iar e*xamenul clinic* se va realiza metodic, minuţios şi complet. Se vor examina cu atenţie toate segmentele, regiunile şi organele, înregistrând orice dismorfie şi încercând obiectivarea unor semne (prin măsurători, fotografiere). Este necesară cunoaşterea perfectă a normalului şi variantelor sale, descrierea precisă a tuturor anomaliilor, minore sau majore, folosind o terminologie adecvată (semeiologie malformativă).

2) *Consultarea* altor specialişti ("de organ") va precede *investigaţiile* paraclinice (imagistice, biochimice, hormonale etc) şi genetice (cromosomice, moleculare). În final se vor sintetiza şi ordona informaţiile şi rezultatele obţinute din diferite surse şi se vor analiza pentru a ajunge la un diagnostic corect şi complet.

3) *Evaluarea datelor* impune luarea în discuţie a unor probleme:

- anomaliile pacientului (inclusiv talia) au debut *prenatal sau postnatal* ?
- pacientul are *una sau mai multe* anomalii congenitale, *majore şi/sau minore*?
- anomalia/anomaliile pacientului se încadrează în: *malformaţii, disrupţii, deformaţii sau displazii*?
- există concomitent o tulburare importantă de creştere (hipostatură, asimetrie), afectare a SNC, visceromegalie, afectare scheletică sau senzorială?
- în cazul unor *anomalii multiple* se poate identifica *o corelaţie* între ele (anomalii primare sau secundare, localizate sau sistemice) sau un element patogenic comun (de exemplu, momentul embriolologic în care s-au produs)?
- în care din cele şase categorii diagnostice s-ar putea încadra pacientul: 1) malformaţie izolată sau secvenţă malformativă; 2)sindrom malformativ; 3) deformaţie sau secvenţă deformativă; 4) disrupţie sau secvenţă disruptivă; 5) displazie sau secvenţă displazică; 6) asociaţie malformativă;
- anomalia poate avea un determinism genetic sau ar putea fi un sindrom teratogen?

4) *Diagnosticul* este deseori dificil, mai ales în cazul anomaliilor congenitale multiple, deoarece există un număr mare de boli, anomalii şi sindroame malformative, greu de cunoscut; în aceste cazuri se va recurge la cărţi, algoritmuri (vezi caseta 9.3), chei sau scoruri de diagnostic, baze de date accesibile pe CD (POSSUM, LDDB) sau prin Internet (Orphanet, GeneClinic, OMIM). La aceste dificultăţi se adaugă şi faptul că fenotipul pacientului poate evolua în timp, făcând mai dificil diagnosticul la adult (în acest caz "albumul din copilărie" ar putea fi un document foarte util).

Un diagnostic corect şi complet cere timp, nu trebuie să ne grăbim, chiar dacă părinţii sunt nerăbdători. In fond puţine cazuri sunt urgenţe iar diagnosticul nostru este o "sentinţă" pentru o boală cronică, de "o viaţă". De aceea medicul trebuie să aibă opinii rezervate după examenul clinic, să explice părinţilor elementele cert anormale şi semnificaţia lor şi să-i îndemne la răbdare, pentru analiza completă a cazului.

5) Destul de des *nu se poate pune un diagnostic specific*. Desigur că în aceste situaţii contează experienţa clinică, capacitatea de investigare şi nivelul de informare al medicului; dar, în cazul bolilor genetice intervin şi alte motivaţii, în primul rând expresivitatea variabilă a bolii la un anumit moment precum şi în timp. *Urmărirea* ulterioară a pacientului şi cunoaşterea cât mai completă a statusului familial se impun cu necesitate în aceste condiţii.

6) Evaluarea diagnostică trebuie să se completeze cu evaluarea *prognosticului*, a capacităţilor de recuperare precum şi a *riscului* genetic de recurenţă.

Comunicarea datelor este o etapă importantă pentru familia pacientului. Medicul trebuie să explice simplu dar clar ce are pacientul, natura genetică a bolii, evoluţia ei, posibilităţile de recuperare şi eventual tratament. Deseori este nevoie de mai multe "şedinţe" şi este foarte bine ca

datele să fie comunicate şi în scris. Problema riscului genetic de recurenţă şi a opţiunilor reproductive se va pune de regulă mai târziu.

4. PROFILAXIA ANOMALIILOR CONGENITALE

Profilaxia primară a anomaliilor congenitale se adresează cauzelor cunoscute, negenetice sau genetice. Deşi factorii teratogeni din mediu au o contribuţie mică (5%) la producerea anomaliilor congenitale, evitarea lor este, în principiu, posibilă. Aceasta presupune o educaţie sanitară adecvată a cuplurilor tinere şi o activitate susţinută a medicilor de familie.

Concepţia unui copil trebuie să se facă pe baza unui planning familial, de preferat până la 35 de ani, în deplină stare de sănătate a genitorilor. Atunci când acest lucru nu este posibil şi femeia suferă de o boală cronică cu risc teratogen (epilepsie, diabet zaharat insulino-dependent, fenilcetonurie ş.a) trebuie luate măsuri adecvate pentru a minimiza efectele teratogene potenţiale (modificarea sau reducerea medicaţiei anticonvulsivante, controlul perfect al glicemiei, restricţie alimentară de fenilalanină).

O atenţie deosebită se acordă în prezent unei suplimentări periconcepţionale cu acid folic (400-800 μg/zi, o lună înainte de concepţie şi două luni după aceea) care scade incidenţa DTN cu peste 75%.

Vaccinarea antirubeolică sistematică a tinerelor fete şi evitarea agenţilor infecţioşi teratogeni în trimestrul I de sarcină ar putea fi o măsură benefică. La aceasta se adaugă renunţarea la fumat, evitarea băuturilor alcoolice, precum şi a administrării neautorizate a oricărui medicament.

În familiile în care există persoane cu anomalii congenitale şi boli genetice cuplurile tinere vor fi îndrumate spre un medic genetician ce poate stabili mărimea riscului şi posibilităţile reducerii sale. Sfatul genetic este în multe ţări o componentă de rutină a sfatului premarital sau preconcepţional.

Profilaxia secundară vizează evitarea naşterii unui făt anormal – în special prin diagnostic prenatal (vezi capitolul 18) – precum şi depistarea precoce, neonatală, a defectelor congenitale, în scopul prevenirii complicaţiilor şi realizării unor măsuri medicale adecvate de recuperare.

C. SEXUALIZAREA NORMALĂ ŞI PATOLOGICĂ

Unul dintre cele mai fascinante subiecte ale biologiei dezvoltării îl reprezintă procesul de sexualizare. El a fost descifrat în mare măsură reprezentând poate cel mai clar model al geneticii dezvoltării. Cunoştinţele actuale privind mecanismele diferenţierii sexuale sunt importante teoretic şi utile practic pentru diagnosticul corect şi managementul eficace al stărilor intersexuale.

Prin sexualizare se înţelege realizarea unui ansamblu de caractere morfologice, funcţionale şi psiho-comportamentale care contribuie la formarea şi fecundarea gameţilor, dezvoltarea şi naşterea unui copil.

Procesul normal de sexualizare se desfăşoară în mai multe etape precis coordonate şi reglate genetic şi umoral(figura 14.12). Prima etapă este stabilirea sexului genetic sau cromosomic (XX sau XY), în momentul fecundării. Apoi, prin acţiunea unor gene de sexualizare de pe cromosomii X şi Y dar şi de pe autosomi, au loc o serie de transformări embriologice secvenţiale complexe care, schematic, pot fi grupate în două procese distincte şi succesive:

- determinismul sexual (sau diferenţierea sexuală primară) care constă în *formarea gonadelor* printr-o serie de evenimente determinate de sexul genetic;
- diferenţierea sexuală (sau diferenţierea sexuală secundară) care urmează după dezvoltarea gonadelor şi duc la formarea *fenotipului sexual*, deci a caracterelor sexuale primare (căile genitale interne, organele genitale externe).

Dezvoltarea sexuală se încheie în cursul vieţii fetale. Cu toate acestea, dobândirea capacităţilor reproductive necesită o serie de modificări fenotipice suplimentare care au loc în cursul pubertăţii, sunt dependente de hormonii gonadali şi vor avea ca rezultat realizarea *caracterelor sexuale secundare*. În acelaşi timp, hormonii gonadali sunt responsabili, încă din cursul vieţii intrauterine şi ulterior în cursul pubertăţii, de producerea unor modificări morfologie şi funcţionale la nivel cerebral, care vor conduce la dobândirea sexualităţii sau a identităţii şi comportamentului sexual.

Înainte de a descrie sintetic procesele embriologice prin care se realizează sexualizarea normală, precum şi determinismul lor, considerăm important să subliniem că numeroase date experimentale (la mamifere) şi clinice (la om) au demonstrat că *planul embrionar de bază al sexualizării la mamifere şi om este înnăscut şi spontan feminin.* La ambele sexe, toate componentele genitale – de la gonade, la organele genitale externe – se dezvoltă din structuri iniţiale ambivalente, *bipotenţiale*. La embrionul XY, diferenţierea sexuală (primară şi secundară) masculină este un proces *activ,* ce implică numeroase molecule (factori de transcripţie, hormoni, receptori) care ”comută” programul standard – feminin – al sexualizării pe direcţie masculină; la embrionul XX sexualizarea este un proces *spontan şi pasiv*, ce se desfăşoară fără intervenţii biochimice şi hormonale majore.

Ar mai fi de remarcat faptul că formarea caracterelor sexuale primare determină un potenţial reproductiv ce face posibilă reproducerea numai în cadrul unei sexualităţi normale (figura 14.12); la specia umană *sexualitatea, ca proces psiho-comportamental, este însă mai importantă ca sexualizarea* morfo-funcţională, deoarece determină o serie de atitudini şi aptitudini care influenţează decisiv viaţa fiecărui om.

În fine, trebuie să înţelegem că *diferenţierea sexuală are un sens mai larg* decât cel definit mai sus deoarece numeroase fenomene biologice din organism sunt asociate sau influenţate de un sex sau altul: de la dezvoltarea embrionară, unele procese metabolice sau formarea şi funcţionarea unor structuri cerebrale (non-dependente de hormoni), până la ratele diferite de recombinări sau mutaţii la cele două sexe sau la fenomenul de amprentare genomică.

1. EMBRIOLOGIA APARATULUI GENITAL

1.1 DETERMINISMUL SEXUAL: FORMAREA GONADELOR

Prima etapă a dezvoltării gonadale este independentă de sexul genetic şi constă în formarea **gonadelor primitive,** *nediferenţiate*; aceste structuri bipotenţiale au o conformaţie identică la ambele sexe. Procesul implică parcurgerea a două faze distincte şi succesive:

- *formarea primordiilor gonadale* (crestele genitale), în săptămânile 3-4 de gestaţie, prin condensarea mezodermului situal medial faţă de mesonefros[10] (precursorul rinichiului) (figura 14-13) şi îngroşarea şi proliferarea epiteliului celomic, care pătrunde în mezenchimul subiacent, formînd *cordoanele sexuale primare*;

[10] Dezvoltarea embrionară reno-urinară, mai ales în primele stadii, este strâns corelată cu dezvoltarea genitală, implicând structuri comune şi intervenţia unor gene ce influenţează ambele procese.

- *migrarea celulelor germinale primordiale* (CGP); acestea se formează, în săptămâna a doua de dezvoltare embrionară, din ectodermul primar al embrionului; apoi, ele se desprind din ectoderm şi migrează, prin mişcări ameboide, în aria extraembrionară (sacul galben). În săptămâna a patra, CGP încep să migreze înapoi în embrion, prin mezenterul dorsal al intestinului primitiv, şi în săptămâna a cincea populează gonada nediferenţiată, unde invadează cordoanele sexuale primare, în curs de formare.

La sfârşitul săptămânii a şasea, gonadele primitive sunt formate dintr-un *cortex extern şi o medulară internă*. Ele conţin patru linii celulare (bipotenţiale) care vor evolua diferit la cele două sexe.

> Cele patru linii celulare sunt: *1) celulele germinale primordiale (CGP)* – care vor forma spermatogoniile sau ovogoniile; *2) celulele de susţinere a CGP* – care vor genera celulele Sertoli, la embrionul XY, sau celulele foliculare, la embrionul XX; *3) celulele steroidogene* – care vor produce hormoni sexuali şi vor forma celulele Leydig (la embrionul masculin) sau celulele tecale (la embrionul feminin); *4) celulele conjunctive* – care vor contribui la formarea organului ca întreg, alcătuind celulele mioide peritubulare şi vascularizaţia testiculelor sau celulele stromale în ovare.

Tot în săptămâna a şasea, concomitent cu gonadele primitive, se formează prin invaginarea epiteliului celomic canalele paramesonefrice (Mülleriene), care se plasează lateral faţă de canalele excretorii ale mesonefrosului (Wolffiene) şi se unesc prin capetele lor caudale.

După această fază indiferentă sau ambisexuală, din săptămâna a şaptea evoluţia sistemului genital se face pe căi diferite la embrionii XY şi XX. Astfel, sub influenţa unui *factor de transcripţie codificat de gena SRY*, începe imediat formarea testiculelor; acest proces este rapid şi, la sfârşitul săptămânii a opta, testiculul fetal produce deja hormoni. Dezvoltarea ovarelor se face *în absenţa proteinei SRY* (sau atunci cînd aceasta este anormală) şi debutează mult mai tardiv, în săptămâna a zecea de gestaţie. Deci, *planul de bază al dezvoltării gonadale este înnăscut şi spontan feminin*.

Formarea testiculelor. Primul eveniment observabil în dezvoltarea testiculelor este apariţia *celulelor primordiale Sertoli*; sub acţiunea proteinei SRY, celulele pre-Sertoli din regiunea medulară a cordoanelor sexuale primitive încep să prolifereaze, se adună în jurul celulelor germinale primitive şi se diferenţază în celule Sertoli (în acest timp partea corticală a cordoanelor sexuale degenerează) (figura 14.14); celulele Sertoli încep să secrete *hormonul anti-müllerian*[11], o glicoproteină care acţionează paracrin, inducând inhibiţia canalelor Müller şi stimulând, probabil, formarea celulelor Leydig.

Celulele germinale primordiale nu sunt o condiţie necesară pentru dezvoltarea testiculelor dar izolarea celulelor germinale în cordoane şi contactul direct cu celulele Sertoli le obligă spre *evoluţie spermatogenetică*: multiplicarea mitotică este inhibată şi astfel se previne (până la pubertate) intrarea celulelor germinale în meioză.

În săptămâna şaptea, celulele Sertoli formează *cordoanele testiculare* (ce vor deveni ulterior tubuli seminiferi); acestea proliferează profund în tesutul conjunctiv din jur, fuzionează între ele la extremitatea lor distală, formând *rete testis* şi, în final, vor pierde contactul cu epiteliul de suprafaţă, fiind separate de acesta prin intermediul tunicii *albuginee* (figura 14.14. A). Cordoanele testiculare sunt necanalizate pe tot parcursul vieţii fetale şi până la pubertate. În săptămâna a opta celulele mezenchimale din jurul cordoanelor se diferenţiază în *celulele Leydig* care vor începe sinteza de testosteron. Dezvoltarea testiculelor este completă la sfârşitul săptămânii a opta de gestaţie.

Formarea ovarelor începe tardiv, după săptămâna a 10-a; până atunci, singurul element care caracterizează ovarul este... absenţa caracterelor testiculare. Apoi, cordoanele sexuale primare degenerează şi din mezoteliul crestei germinale se formează *cordoanele sexuale*

[11] Celulele Sertoli secretă de asemeni inhibina, protejează şi hrănesc celulele germinale, sintetizează un factor de legare a androgenilor şi inhibă meioza în cursul vieţii fetale.

secundare corticale (figura 14-14.B). În săpătămâna a 16-a, aceste cordoane se fragmentează în grămezi, înglobează celulele germinale primordiale diploide, diferenţiate în ovogonii, devenind *foliculi primordiali*[12]; celulele epiteliale din jurul celulelor germinale se vor diferenţia în celule granuloase iar celulele mezenchimale externe devin *celulele tecale***,** echivalentul celulelor Leydig.

La fetusul feminin, celulele germinale primordiale *continuă să prolifereze* prin mitoză şi se diferenţiază în ovogonii; apoi (săptămâna 11-12) ele intră în prima diviziune meiotică ca *ovocite primare*; atunci când sunt înconjurate de celulele pregranuloase, formând foliculii primordiali, contactul strâns cu celulele foliculare duce la *oprirea meiozei* (în diploten), până la pubertate; o parte din ovogonii nu vor fi incluse în foliculi şi mor prin *apoptoză*. Formarea foliculilior primordiali se termină la 6 luni după naştere.

De subliniat două aspecte:

- spre deosebire de fetusul XY, la fetusul XX formarea ovarelor este dependentă de prezenţa celulelor germinale; în absenţa lor, gonada nediferenţiată degenerează într-un ţesut nefuncţional, fibros, "*streak gonad*".
- dezvoltarea ovarelor este cronologic mai tardivă decât a testiculelor, se termină în luna V-a şi nu influenţează diferenţierea sexuală (care are loc aproape concomitent cu dezvoltarea gonadală) pentru că nu produc hormoni.

În timpul vieţii fetale, testiculele şi ovarele *coboară* din poziţia lor iniţială (de la nivelul vertebrei T10), tractate de un cordon ligamentos numit *gubernaculum.* În săptămânile 12-24, testiculele migrează (prin scurtarea gubernaculumului, sub acţiunea androgenilor şi a unui factor proteic înrudit cu insulina – vezi mai jos) şi ajung la nivelul *inelului inguinal intern,* deasupra scrotului; în săptămâna 28 ele încep să coboare în scrot şi, la majoritatea fetuşilor, ajung în această poziţie la termen. La fetusul feminin nu se produce scurtarea gubernaculumului şi ovarele ramân în poziţie pelvină.

1.2 DIFERENTIEREA SEXUALĂ

Sexul gonadic induce dezvoltarea **sexului fenotipic** adică formarea ductelor genitale şi a organelor genitale externe de tip feminin sau masculin, prin modificări caracteristice ale ductelor Wolf şi Müller, respectiv ale sinusului urogenital. Formarea structurilor de tip masculin este dependentă de secreţia activă a hormonilor produşi de testiculii fetali, în timp ce formarea structurilor de tip feminin nu necesită prezenţa nici unui hormon.

Formarea căilor genitale interne. Indiferent de sexul genetic, fetusul prezintă două structuri canaliculare: *ductele mesonefrice (Wolffiene) şi ductele paramesonefrice* (Mülleriene) din care se vor dezvolta, în luna a treia, căile genitale interne (CGI).

- *Formarea CGI masculine* este un proces *activ* care se desfăşoară sub acţiunea hormonilor testicului fetal: *testosteronul* (acţionând local) determină, în săptămânile 8–13, stabilizarea ductelor Wolffiene şi difereneţierea lor în epididim, vase deferente şi vezicule seminale; canalele Mülleriene regresează (în săptămânile 8-10), prin acţiunea locală a hormonului anti-müllerian (AMH), secretat de celulele Sertoli (singurul rest din canalele Mülleriene este utricula prostatică).
- *Formarea CGI feminine* are loc în săptămânile 9-13, în mod *spontan*, în absenţa secreţiilor endocrine ale ovarelor (care nici nu sunt încă formate!): ductele Wolffiene regresează iar ductele Mülleriene se dezvoltă în trompe, uter şi treimea superioară a vaginului.

Formarea organelor genitale externe (OGE) se realizează, în lunile a patra şi a cincea, pe seama *sinusului uro-genital* – o structură ambivalentă, bipotenţială, prezentă la ambele sexe,

[12] La fetusul de 5 luni există aproximativ 7 milioane de foliculi primordiali; mulţi degenerează însă până la naştere (700.000 – 2.000.000) şi apoi până la pubertate, când rămân numai circa 400.000 foliculi.

şi alcătuită dintr-o protuberanţă mediană numită *tuberculul genital*, două pliuri mediale sau *pliurile uretrale* (sau urogenitale), ce flanchează *şanţul urogenital*; la exteriorul lor se formează două pliuri mai mari, numite *pliurile (bureletele) labioscrotale*.

- *Formarea OGE masculine.* Sub influenţa androgenilor, în special a *dihidrotestosteronului (DHT),* tuberculul genital se alungeşte şi formează *penisul*[13], pliurile uretrale *fuzionează,* dinapoi spre înainte, formând *uretra peniană,* iar pliurile labioscrotale cresc şi se unesc, formând *scrotul.*
- *Formarea OGE feminine.* În absenţa androgenilor, la fetusul feminin normal, tuberculul genital creşte puţin, formând *clitorisul*, sinusul urogenital (SUG) rămâne deschis şi se formează *septul vezicovaginal* între porţiunea genitală şi urinară a SUG, astfel că uretra se deschide anterior iar vaginul posterior; vestibulul SUG este mărginit lateral de pliurile urogenitale, care nu fuzionează şi formează *labiile mici;* lateral, pliurile labioscrotale se dezvoltă, formând *labiile mari* (unite posterior şi anterior).

Formarea identităţii şi comportamentului sexual. După naştere, pe baza configuraţiei OGE, se declară sexul civil şi apoi copilul este crescut ca fată sau băiat, într-un mediu socio-cultural adecvat. La vârsta de 2-3 ani se stabileşte *identitatea sexuală* definită prin conştientizarea apartenenţei la un anumit sex. La pubertate, sub acţiunea hormonilor sexuali, se formează caracterele sexuale secundare (*sexul pubertar*) şi se edifică *comportamentul sexual* sau expresia publică / socială a identităţii sexuale. Aşa cum am subliniat la început, acest proces, numit şi sexualitate, este la om mai important decât sexualizarea morfo-funcţională.

2. CONTROLUL GENETIC ŞI HORMONAL AL SEXUALIZĂRII

2.1 REGLAREA GENETICĂ A DEZVOLTĂRII GONADELOR

Se ştie de câteva decenii că sexualizarea masculină este determinată de cromosomul Y: în prezenţa cromosomului Y, indiferent de numărul cromosomilor X, se formează testicule; în absenţa cromosomului Y se formează ovare (care însă nu au o structură şi funcţie normală decât în prezenţa ambilor cromosomi X). Efectul *dominant* al cromosomului Y este determinat de prezenţa unei/unor gene situate într-o mică regiune de pe braţul scurt, numită TDF (de la *Testis Determining Factors*). Studiul molecular a unor cazuri de *inversiuni sexuale* (în care sexul fenotipic este discordant faţă de cel genetic: bărbaţi XX, unele femei XY, ş.a) a dus, în 1990, la identificarea genei SRY (de la *Sex-determining Region on the Y chromosome*) prezentă la toate mamiferele şi capabilă să inducă formarea testiculelor (introducerea genei SRY la un embrion XX de şoarece determină apariţia de testicule şi diferenţierea masculină)

Gena SRY – pentru gonade şi hormonii testiculelor fetale – pentru CGI şi OGE, nu sunt însă singurii "actori" ai procesului de dezvoltarea sexuală, un proces secvenţial, ordonat şi extrem de complex. Studiile din ultimii ani au început descifrarea mecanismelor genetice care sunt responsabile de etapele sexualizării şi au permis înţelegerea unor aspecte din patologia acestor procese. Cert este faptul că determinismul şi diferenţierea sexuală sunt reglate de un complex de gene, factori de transcripţie, hormoni şi receptori (tabel 14.7).

Tabelul 14.7. Principalele gene implicate în dezvoltarea gonadelor masculine şi feminine

Gena	*Localizare cromosomică*	*Proteina codificată*	*Funcţia proteinei*	*Fenotipul asociat mutaţiei*

[13] Penisul creşte în lungime cu circa 0,7 mm/săptămână atingând la termen dimensiunea normală de 3,5 cm

Gena	*Localizare cromosomică*	*Proteina codificată*	*Funcţia proteinei*	*Fenotipul asociat mutaţiei*
WT1	11p13	Proteina cu degete de zinc	Dezvoltarea gonadelor primitive şi a rinichilor; reglarea expresiei SRY	Pseudohermafroditism masculin şi disgenezie gonadică XY
SF1	9q33	Receptor nuclear	Dezvoltarea gonadelor primitive; reglarea sintezei de hormoni steroidieni	Mutaţiile heterozigote: disgenezie gonadică şi insuficienţa suprarenaliană
LIM1	11p12-13	Proteina homeobox	Dezvoltarea precoce a gonadelor şi a extremităţii cefalice	?
LHX9	1q31-32	Proteina homeobox	Dezvoltarea precoce a gonadelor şi creierului anterior	?
EMX2	10q26.1	Proteina homeobox	Dezvoltarea precoce a gonadelor şi a neocortexului	Schizencefalia tip II
SRY	Yp11	Proteina HMG	Iniţiază dezvoltarea testiculară	Disgenezie gonadică XY (inversiune sexuală)
SOX9	17q24	Proteina HMG	Initiază dezvoltarea testiculară; diferenţierea celulelor Sertoli	Displazie campomelică cu disgenezie gonadică
DMRT1	9p24.3	Proteina DM	Menţinerea tubilor seminiferi după naştere	Disgenezie gonadică XY
FGF9	13q11-12	Factor de creştere	Proliferarea în gonada masculină şi dezvoltarea plămânilor	Inversiune sexuală
CBX2	17q25	Proteina cromobox	Dezvoltarea testiculară	?
DHH	12q13.1	Proteina cu rol în semnalizare	Reglator al celulelor Sertoli	Disgenezie gonadică XY şi neuropatie minifasciculară
DAX1	Xp21.3	Receptor nuclear	Antagonizează efectele SRY	Duplicaţia: disgenezie gonadică XY; hipoplazie suprarenaliană congenitală
WNT4	1p32-36	Glicoproteina secretată	Represia diferenţierii celulelor Leydig în gonadele feminine; Stimulează activitatea DAX1.	Duplicaţia: disgenezie gonadică XY

a. Formarea gonadelor primordiale reprezintă prima etapă în dezvoltarea gonadelor. Aşa cum am arătat, acest proces începe cu *formarea primordiilor gonadale nediferenţiate, bipotenţiale* din mezodermul intermediar şi *migrarea celulelor germinale primordiale,* care populează cordoanele sexuale primare din gonada nediferenţiată.

- Studiul mutaţiilor în diferite stări intersexuale au identificat câteva gene care sunt esenţiale pentru dezvoltarea *primordiilor gonadale*. Printre acestea se numără genele **SF-1**, **WT1**, **LIM1**, **LHX9** şi **EMX2** (tabelul 14.7); aceste gene, care codifică factori de transcripţie generali, *nu sunt specific sexuale* şi intervin şi în alte procese embrioanre; dar *o combinaţie specifică* de acţiuni este probabil critică pentru formarea gonadelor primordiale. Mutaţiile acestor gene pot avea drept consecinţă absenţa dezvoltării gonadelor, alături de alte anomalii (absenţa suprarenalelor în cazul genei SF1 sau absenţa rinichilor în cazul mutaţiilor genei WT1 şi LIM1).
  - *Gena SF-1* codifică *factorul de transcripţie steroidogenic 1(FS1),* un receptor nuclear (cu ligand necunoscut) care se fixează la ADN (pe secvenţa AGGTCA) şi activează genele implicate în steroidogeneză; dar SF1 intervine şi în dezvoltarea embrionară a regiunilor cu funcţie endocrină: gonade primordiale la ambele sexe, suprarenale, hipofiză şi nucleii hipotalamici implicaţi în producerea de gonadotropine. SF-1 reglează probabil şi alte gene ce acţionează în etapele următoare ale dezvoltării gonadale: AMH, WT1, DAX-1 şi poate chiar SRY, fie direct sau indirect (printr-o etapă intermediară).
  - *Gena WT1* – codifică (prin matisare alternativă) mai multe proteine cu funcţii diferite, ce funcţionează ca factori de transcripţie ce activează alte gene (încă necunoscute) implicate în formarea rinichilor şi gonadelor primordiale; mutaţiile genei WT1 determină sindromul Denys-Drash şi sindromul Frasier, afecţiuni în care pacienţii XY nu au gonade iar OGE sunt ambigue sau feminine.

- *LIM1, LHX9, EMX2* – codifică proteine homeobox implicate în dezvoltarea gonadelor primordiale dar şi a altor structuri embrionare

▪ *Migrarea celulelelor germinale şi colonizarea gonadei primordiale* este controlată (la şoarece şi probabil la alte mamifere) de genele *c-Kit* şi *slf* ce codifică un receptor nuclear (c-Kit) şi, respectiv, factorul Steel, ligandul pentru acest receptor.

După formarea gonadei primordiale, sexualizarea evoluează diferit la cele două sexe.

b. Formarea testiculelor. La embrionul XY, diferenţierea gonadelor primordiale în testicule este iniţiată de expresia **genei SRY** (localizată pe cromosomul Yp11.3) la nivelul liniei precursorilor celulelor de susţinere care, sub acţiunea SRY, se *diferenţiază în celule Sertoli* (în absenţa SRY această linie formează celule foliculare); acesta este primul eveniment al diferenţierii testiculare.

Expresia genei SRY este declanşată[14] la circa 7 săptămâni de gestaţie şi este tranzitorie, deci SRY nu este implicată în *menţinerea* diferenţierii celulelor Sertoli, acest proces fiind realizat de alte gene, activate de SRY. Gena SRY este alcătuită dintr-un singur exon, care codifică o proteină (204 aminoacizi) cu rol de factor de transcripţie – printr-un un domeniu HMG (*high motility group*) de legare la ADN, puternic conservat la toate mamiferele.

Gena SRY este o *genă master* care reglează transcripţia altor gene (încă necunoscute) ce acţionează *în aval* de SRY; se presupune că SRY reprimă *gena DAX-1* (situată pe cromosomul X şi implicată în formarea ovarelor) şi prin aceasta activează *gena SOX9*.

Alături de gena SRY sunt implicate şi o serie de gene autosomale (tabelul 14.7 şi figura 14-15). Printre acestea, **gena SOX-9** pare a avea un rol major, fiind considerată efectorul principal ce acţionează în aval de SRY.

Gena SOX9, localizată pe cromosomul 17, codifică o proteină înrudită cu SRY, având un domeniu HMG de legare la ADN, puternic conservat. Mutaţiile acestei gene sunt implicate în producerea displaziei campomelice, o boală care asociază anomalii scheletice cu inversiune sexuală (femei XY).

Gena SOX9 dirijează procesul de *organizare cordoanelor testiculare,* din care se vor forma tubii seminiferi, de către celulele Sertoli; în acest proces de interacţiuni celulă-celulă intervin probabil şi molecule de semnalizare celulară din familia WNT.

Gena SOX9 intervine şi activează **gena AMH** (un membru al familiei TGFβ) în celulele Sertoli. Această genă codifică *hormonul anti-Müllerian* care determină regresia ductelor Mülleriene şi, probabil, controlează transformarea celulelor interstiţiale nediferenţiate în celule Leydig, precum şi coborârea testiculelor. Efectul genei SOX9 este potenţat de genele SF1,WT1 şi GATA4 care se fixează pe promotorul genei AMH.

O etapă importantă în formarea testiculelor este *diferenţierea celulelor germinale primordiale în spermatogonii*. CGP sunt programate să se multiplice prin mitoză, să intre apoi în meioză şi să se oprească în profază (aşa cum se întâmplă în ovare); celulele Sertoli produc însă un factor, încă necunoscut, care le opreşte în mitoză şi determină astfel evoluţia lor spermatogenică.

Un ultim proces din formarea testiculelor este *diferenţierea celulelor Leydig* din celulele mezenchimale din jurul cordoanelor; acest proces este controlat de mai multe gene, printre care AMH şi SF1.

Alte gene implicate în dezvoltarea testiculelor, ale căror mutaţii produc inversiune sexuală, sunt **DMRT1**, **FGF9** şi **CBX2**; locul lor de acţiune nu este încă precizat. Se ştie doar că DMRT1 este exprimată, ca şi SOX9 la începutul dezvoltării testiculare iar mutaţiile genei **DHH** produc absenţa spermatogenezei.

c. Formarea ovarelor. Reglarea genetică a formării ovarelor este mai puţin cunoscută. Se cunosc doar câteva gene cu rol major în acest proces precum genele **DAX-1** şi **WNT4**.

[14] Activarea genei SRY ar putea fi produsă sau potenţată de către gena WT1 deoarece în regiunea promotor a SRY a fost descris un situs de fixare a unui factor de transcripţie produs de WT1

Dezvoltarea normală a ovarelor necesită funcţionarea ambelor alele ale genei DAX1 (dovezi: disgenezia ovariană la fetuşii cu 45,X sau sindrom Turner ori formarea de ovare în bandeletă la fetuşii XY purtători ai duplicaţiei regiunii în care se află DAX-1). La fetusul XX gena DAX-1 inhibă gena SOX9 (la embrionul XY gena SRY represează DAX1 şi astfel activează gena SOX9). Gena WNT4 are drept rol inhibarea căilor de semnalizare care conduc la diferenţierea celulelor Leydig.

2.2. CONTROLUL DIFERENŢIERII SEXUALE

Formarea CGI şi OGE masculine sau feminine depinde de *prezenţa sau absenţa ţesutului testicular funcţional*.

La sexul masculin, după formarea testiculelor, la circa 8 săptămâni, acestea determină un fenotip sexual masculin prin producerea de **hormoni, enzime şi receptori** care mediază acţiunea lor[15]: hormonul luteinizant fetal (LH), receptorul LH şi HCG, enzimele implicate în biosinteza testosteronului, hormonul anti-müllerian (AMH) şi receptorul de AMH, steroid 5α-reductaza 2 (implicată în conversia testosteronului în dihidrotestosteron), receptorul de androgen.

- Diferenţierea ductelor Wolffiene în CGI masculine necesită *testotseron,* secretat de celulele Leydig, după activarea receptorului LH/CG de pe suprafaţa lor de către HCG în trimestrul I de sarcină şi apoi de LH fetal; acţiunea testosteronului este mediată de *receptorul nuclear de androgeni* (AR), un factor de transcripţie care după fixarea hormonului interacţionează cu promotorul unor gene ţintă incomplet cunoscute (una din ele este gena pentru receptorul AMH).
- Regresia ductelor Mülleriene este indusă de *hormonul anti-müllerian* (AMH)[16], un hormon glicoproteic (din clasa TGF-β) secretat de celulele Sertoli; secreţia de AMH este indusă de factori incomplet cunoscuţi (probabil de produşii genelor SF-1 şi SRY). Acţiunea AMH necesită un *receptor specific*, AMHR (o proteină transmembranară cu activitate serin-treonin kinazică a cărei sinteză este reglată în parte de gena AR); receptorul este situat în mezenchimul ce înconjoară canalele Mülleriene; interacţiunea AMH-AMHR induce involuţia lor prin apoptoză. Mutaţiile genei pentru AMF sau pentru receptorul său au ca rezultat sindromul persistenţei canalelor Müller.
- Masculinizarea OGE nediferenţiate (sinusul urogenital) se face prin acţiunea *dihidrotestosteronului*, produs prin conversia testosteronului de către 5α-reductaza 2; el are o mare afinitate pentru *receptorii de androgeni* (AR), codificaţi de o genă situată pe Xq11. Complexul DHT-AR se fixează pe promotorii unor gene ţintă ce controlează masculinizarea OGE. Mutaţiile la nivelul acestei gene au ca rezultat sindromul de insensibilitate la androgeni.
- Un alt hormon produs de către celulele Leydig este *insulin-like hormone 3* (InsL3) care este implicată în controlul iniţial al coborârii testiculilor fetali de la nivelul de formare până în punga scrotală. Insulina 3 este exprimată la nivelul gubernaculum-ului care dirijează descendenţa testiculilor fetali. Mutaţiile la nivelul acestei gene au drept rezultat criptorhidia bilaterală. Alte gene implicate în coborârea testiculară sunt HOX10 şi HOX11.

La sexul feminin se produce în mod normal regresia canalelor Wolf şi diferenţierea canalelor Müller şi a sinusului urogenital în structuri feminine. Aceste procese se produc *spontan şi pasiv*, fără nici o intervenţie hormonală deoarece ovarele nu sunt încă complet formate.

Unul dintre aspectele importante dar cele mai puţin înţelese din cadrul dezvoltării sexuale

---

[15] Trebuie precizat că influenţa testiculilor fetali asupra dezvoltării căilor genitale este exercitată exclusiv unilateral; dacă unul din testiculi nu se dezvoltă sau este îndepărtat precoce în cursul vieţii fetale (experimente la animale), are loc dezvoltarea normală a oviductului ipsilateral, asociată cu involuţia controlaterală a ductului Muller.

[16] AMH a mai fost denumit şi MIF, de la *Mullerian inhibitng factor*

este *determinismul comportamentului sexual* specific fiecărui sex. O serie de date experimentale cât şi unele observaţii derivate din studiul unor stări patologice la om susţin însă rolul major al hormomilor sexosteroizi în dezvoltarea comportamentului sexual. Hormonii sexuali par să acţioneze în cursul vieţii fetale şi în cursul perioadei neonatale asupra unor structuri specifice de la nivelul sistemului nervos central (hipotalamusul anterior şi sistemul limbic) determinând o organizare neuronală caracteristică fiecărui sex, care reprezintă astfel "substratul anatomic" al comportamentului sexual. Interesant este faptul că hormonul principal responsabil de organizarea de tip masculin a creierului la bărbaţi este *estradiolul*, produs prin conversia locală a testosteronului, sub acţiunea *aromatazei*[17]. La fetuşii de tip feminin există desigur estradiol circulant dar acesta este legat de alpha-fetoproteină, o componentă majoră a serului fetal. Această proteină nu poate însă lega testosteronul, care va atinge astfel ţintele cerebrale.

Alterarea acestei organizări specifice a creierului în cursul vieţii fetale şi în perioada neonatală este considerată a fi implicată în etiologia homosexualităţii.

3. TULBURĂRI ALE DEZVOLTĂRII SEXUALE

Fiecare etapă din cadrul determinismului şi diferenţierii sexuale poate fi perturbată producând tulburări variate de sexualizare[18] (tabelul 14.8). Cauzele unor asemenea afecţiuni sunt multiple, de la factori de mediu, precum administrarea unor medicamente cu efect virilizant în cursul sarcinii, la anomalii cromosomice (monosomia X), mutaţii monogenice (sindromul testicululuui feminizant) sau cauze multifactoriale precum în majoritatea cazurilor de hipospadias. Există dificultăţi reale de clasificare a acestor boli şi, ca urmare, categoriile descrise mai jos prezintă adeseori suprapuneri parţiale.

Tabelul 14.8. Clasificarea tulburărilor de dezvoltare sexuală
(după Wilson JD şi Griffin JE, 2001)

Anomalii ale cromosomilor sexuali
▪ Sindromul Klinefelter
▪ Bărbaţii XX
▪ Sindromul Turner
▪ Disgenezia gonadică mixtă
▪ Hermafroditismul adevărat
Anomalii ale formării sexului gonadic
▪ Disgenezia gonadică pură
▪ Disgenezia testiculară
▪ Sindromul testiculilor absenţi
Anomalii ale diferenţierii sexuale
▪ **Pseudohermafroditismul feminin**
− Hiperplazia congenitală suprarenaliană
− Pseudohermafroditismul feminin nonadrenalian
− Anomalii ale dezvoltării ductelor mulleriene
▪ **Pseudohermafroditismul masculin**
− Anomalii ale sintezei androgenilor
− Anomalii in acţiunea androgenilor

[17] Şoarecii XY cu deficit de aromatază sau receptori de estrogeni nu au comportamentul masculin specific.
[18] Clasificările tulburărilor de sexualizare folosite de diferiţi autori prezintă unele mici diferenţe; noi am optat pentru o clasificare recentă şi simplă.

Anomalii ale cromosomilor sexuali
▪ Sindromul Klinefelter ▪ Bărbaţii XX ▪ Sindromul Turner ▪ Disgenezia gonadică mixtă ▪ Hermafroditismul adevărat
– Sindromul de persistenţă a ductelor mülleriene – Defecte în dezvoltarea organelor genitale masculine

3.1. ANOMALIILE CROMOSOMILOR SEXUALI

Acest grup frecvent de boli cuprinde tulburările de dezvoltare sexuală care sunt rezultatul unor anomalii cromosomice de număr sau de structură, omogene sau în mozaic. Deoarece sindroamele Klinefelter şi Turner au fost discutate pe larg în capitolul 10, aici vor fi prezentate celelalte entităţi din tabelul 14.8.

a. Sindromul bărbaţilor XX este o afecţiune întâlnită la circa 1 la 20000 nou-născuţi cu fenotip masculin. Trăsăturile clinice seamănă cu cele ale unui sindrom Klinefelter.

> Testiculi sunt mici şi fermi (sub 2 cm), ginecomastia este frecventă, penisul are dimensiuni normale sau scăzute; alte elemente caracteristice sunt hialinizarea testiculară cu azoospermie şi absenţa oricăror structuri urogenitale de tip feminin. Identitatea psihosocială este de tip masculin, nivelele plasmatice ale testosteronului sunt scăzute iar nivelele estradiolului şi gonadotropinelor plasmatice crescute. Bărbaţii XX au talia sub nivelul mediu al bărbaţilor normali, nu prezintă probleme cognitive, iar incidenţa hipospadiasului este crescută.

Majoritatea bărbaţilor XX au translocaţii ale unui mic segment din Yp (ce conţine gena SRY) pe Xp; există însă şi cazuri produse de mutaţii ale unor gene autosomale implicate în dezvoltarea testiculară.

b. Disgenezia gonadică mixtă este determinată cel mai adesea de mozaicisme 45,X/46XY care apar prin pierderea cromosomului Y în una din primele diviziuni postzigotice. Indivizii afectaţi au de regulă un testicul pe o parte şi un ovar fibrozat de cealaltă parte, dar pot exista şi testiculi disginetici sau ovare fibrozate bilateral. Incidenţa afecţiunii nu este cunoscută, dar este considerată a doua cauză de ambiguitate a organelor genitale externe la nou-născuţi după hiperplazia congenitală suprarenaliană.

> Fenotipul depinde de proporţia şi distribuţia în organism a celulelor XY. La două treimi din cazuri domină fenotipul feminin, dar cu hipertrofie clitoridiană, sinus urogenital şi fuziune parţială labioscrotală. Testiculul este localizat cel mai adesea intraabdominal, dar poate fi prezent şi intrainghinal. Aproape invariabil sunt prezente uterul, vaginul şi cel puţin o trompă uterină. Postpubertar testiculul, care conţine numerose celule Leydig şi tubi seminiferi numai cu celule Sertoli, va secreta androgeni, determinând fenomene de virilizare.

c. Hermafroditismul adevărat[19] este o condiţie în care sunt prezente ambele tipuri de gonade la acelaşi individ. Afecţiunea are o incidenţă necunocută, până în prezent fiind descrise circa 400 de cazuri. Există mai multe variante: forme laterale (testicul pe o parte şi ovar de cealaltă parte – 40%), forme unilaterale (un ovotestis pe o parte şi testicul sau ovar controlateral – 40%) şi forme bilaterale (ovotestis de fiecare parte – 20%). OGE sunt de obicei sub formă de peno-clitoris (hipospad) şi labio-scrot.

Circa două treimi din cazuri prezintă cariotip 46,XX, 10% au cariotip 46,XY iar restul sunt himere (XX/XY produse printr-o dublă fecundare) sau mozaicuri cu cel puţin o linie celulară cu un cromosom Y prezent. Mecanismul dezvoltării anormale a gonadelor nu este cunoscut. Doar 10% din cazurile 46,XX prezintă gena SRY ca urmare a translocaţiei unei porţiuni a cromosomului Y. Restul sunt considerate a fi rezultatul unor mutaţii cu câştig de funcţie ale unor

[19] Denumirea de hermafroditism care provine de la imbinarea numelor zeului Hermes şi a zeiţei Afrodita.

gene situate în aval faţa de SRY în calea de dezvoltare testiculară.

3.2. ANOMALII ALE FORMĂRII SEXULUI GONADIC

Aceste afecţiuni sunt caracterizate prin prezenţa unui cariotip normal, dar cu anomalii în structura gonadelor.

a. Disgenezia gonadică pură cuprinde un grup de afecţiuni în care persoanele bolnave au un cariotip normal XX sau XY, sunt fenotipic femei şi prezintă gonade cu structură anormală, adesea sub forma unor bandelete fibrozate. Se asociază frecvent o dezvoltare redusă a uterului şi a trompelor uterine precum şi a caracterelor sexuale secundare.

Disgeneziile gonadice pure sunt determinate de mutaţii la nivelul unor gene esenţiale pentru dezvoltarea gonadelor. Există chiar forme familiale care sugerează o transmitere autosomal recesivă sau legată de X. În formele cu cariotip 46,XY pot exista mutaţii punctiforme sau deleţii la nivelul genei SRY sau a altor gene care influenţeaza expresia SRY.

b. Disgenezia testiculară cuprinde un grup de tulburări ale dezvoltării testiculare care sunt prezente la indivizi cu cariotip 46,XY. Anomaliile testiculare pot merge de la unele foarte severe, asemănătoare cu cele din disgenziile gonadice pure, care conduc la inversiune sexuală, până la unele mai puţin severe. Deoarece genele implicate în producerea acestor boli (WT1, SF1, SOX9, DAX1, WNT4) controlează şi dezvoltarea altor ţesuturi, acestor anomalii li se asociază frecvent şi alte afectări sistemice.

c. Sindromul testiculelor absente (agenezia gonadică) cuprinde un spectru larg de manifestări fenotipice prezente la indivizi 46,XY cu testicule rudimentare sau absente, dar cu dovadă neechivocă că funcţia testiculară endocrină (precum regresia ductelor Muller sau sinteza de testosteron) a existat cândva în cursul vieţii embrionare. În contrast, în disgenezia gonadică pură XY nu există nici o dovadă a activităţii testiculare endocrine în cursul vieţii embrionare. Cauzele regresiei funcţiei testiculare pot fi diverse, precum mutaţii ale unor gene, factori teratogeni sau traumatisme.

> În forma pură de agenezie testiculară indivizi 46,XY sunt fenotipic femei, dar nu prezintă deloc structuri derivate din ductele Muller, şi nici organe accesorii ale aparatului reproductiv de tip masculin. În aceste cazuri eşecul testicular a apărut după dezvoltarea celulelor Sertoli capabile să secrete hormon antimullerian, dar înainte de debutul funcţiei celulelor Leydig. La extrema cealaltă sunt indivizi fenotipic bărbaţi dar cu anorhie bilaterală (cu organe genitale externe masculine, dar adeseori microfalus, absenţa structurilor mulleriene şi prezenţa celor wolffiene).

3.3. ANOMALII ALE DIFERENŢIERII SEXUALE

Acest grup de boli cuprinde pseudohermafroditismele (PH) feminine şi masculine, afecţiuni în care există o discordanţă între sexul genetic şi gonadic, normale şi concordante, şi OGE ambigue. În funcţie de sexul genetic se deosebesc două forme: PH feminine (XX, ovare şi diferite grade de masculinizare a OGE) – 85% din stările intersexuale şi PH masculine (XY, testicule şi OGE incomplet masculinizate) – 14% dintre stările intersexuale.

a. Pseudohermafroditismele feminine apar la femei 46,XX cu ovare bilaterale, dar cu grade variabile de virilizare a tractului genital, datorită excesului de androgeni în cursul vieţii fetale.

Hiperplazia congenitală suprarenaliană este cauza cea mai frecventă de pseudohermafroditism feminin şi este consecinţa unor anomalii în căile de sinteză a hormonilor steroidieni la nivelul glandei suprarenale (figura 14-16). Cea mai frecventă formă de este cauzată de deficitul de 21 hidroxilază (prezentată pe larg în caseta 3.2), dar pot fi implicate şi deficitele de 11-beta-hidroxilază ori 3-beta-hidroxisteroid dehidrogenază izomerază 2 (tabelul 14.9).

Tabelul 14.9. Forme de hiperplazie congenitală de suprarenală

Deficienţa	*Cortisol*	*Aldosteron*	*Grad de virilizare la femei*	*Esecul virilizării la bărbaţi*	*Hormonul steroidian dominant*	*Alte caracteristici*
21-hidroxilază - parţială - severă (cu pierdere de sare)	Normal Redus	Exces Redus	++++ ++++	Absent Absent	17-hidroxiprogesteron 17-hidroxiprogesteron	95% cazuri 5%
11-beta-hidroxilaza	Redus	Redus	++++	Absent	11-deoxicortisol si 11-deoxicorticosteron	Hipertensiune arterială
3-beta-hidroxisteroid dehidrogenaza izomeraza 2	Redus	Redus	+	++++	dehidroepiandrosteron	Deseori pierdere de sare. A doua ca frecvenţă.
17-alfa-hidroxilaza	Redus	Redus	Absent	++++	corticosteron şi 11-deoxicosticosteron	Hipertensiune arterială

Pseudohermafroditismul feminin nonadrenalian poate fi determinat de mutaţii la nivelul genei care codifică *aromataza placentară* (CYP19) care cauzează virilizarea embrionilor feminini datorită conversiei deficitare a androgenilor în estrogeni. Pseudohermafroditismul feminin poate apărea, de asemenea, ca urmare a unor *tumori ovariene virilizante* (precum areoblastoame sau luteoame) sau mai rar ca urmare a unor *tumori virilizante suprarenaliene*. De asemenea, administrarea unor *compuşi progesteronici* cu efecte secundare androgenice (precum 17-alfa-19-nortestosteronul) pentru prevenirea avorturilor poate determina masculinizarea fetuşilor feminini.

Anomaliile dezvoltării ductelor mulleriene (sindromul Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser) reprezintă a doua cauză de amenoree ca frecvenţă după sindromul Turner. Majoritatea pacientelor sunt identificate ca urmare a absenţei menstruaţiilor la vârsta pubertară. Înălţimea este normală, ca şi caracterele sexuale secundare. Uterul poate varia de la aproape normal până la forma bicornuată rudimentară cu sau fără lumen. Se poate asocia cu anomalii renale (agenezie, ectopie, rinichi în potcoavă) sau scheletice (vertebre supranumerare, asimetrice sau fuzionate – sindromul Klippel-Feil).

b. Pseudohermafroditismele masculine (defecte în virilizarea embrionilor 46,XY) pot apărea ca urmare a unor defecte în sinteza androgenilor, defecte în acţiunea androgenilor, defecte în regresia ductelor mulleriene sau ca urmare a unor cauze incerte.

(1) Anomaliile în sinteza hormonilor androgeni sunt responsabile doar de aproximativ o cincime din cazurile de pseudohermafroditism masculin. În această categorie se încadrează agenezia celulelor Leydig sau hipoplazia lor produsă printr-un defect al receptorilor hCG/LH precum şi deficite enzimatice ce afectează biosinteza androgenilor. Fiecare dintre aceste defecte blochează o etapă în conversia colesterolului către testosteron (vezi figura 14-16) :

- mutaţia genei STAR (care codifică reglatorul steroidogenetic) afectează transportul colesterolului din citoplasmă către interiorul mitocondriei la nivelul glandelor suprarenale şi a gonadelor; produc hiperplazia lipoidă congenitală de suprarenală);
- deficienţa 3 beta hidroxisteroid dehidrogenazei izomeraza 2 alterează transformarea dehidroepi-androstendionului în androstendion;
- deficienţa de 17 alpha hidroxilază (CYP17) alterează hidroxilarea în poziţia 17 a pregnenolonului şi progesteronului;
- deficienţa 17,20 liazei alterează transformarea 17 OH steroizilor în 17 cetosteroizi;
- deficienţa 17 beta hidroxisteroid dehidrogenazei 3 – cea mai frecventă formă – afectează ultima etapă în sinteza testosteronului, reducerea grupării 17-ceto a androstendionului.

Toate aceste boli cu defecte în sinteza testosteronului sunt caracterizate prin regresia normală a ductelor Müller. Masculinizarea tractului urogenital este variabilă, de la aspect masculin cu hipospadias moderat până la aspect feminin, în funcţie de severitatea defectelor enzimatice şi existenţa unor căi alternative.

(2) **Anomaliile în acţiunea androgenilor** se caracterizează prin sinteza normală a testosteronului şi regresia normală a canalelor Muller, prezenţa anomaliilor în dezvoltarea fenotipului masculin fiind determinată de tulburări în acţiunea androgenilor la nivelul ţesuturilor ţintă.

Deficienţa 5 alpha reductazei 2 este o boală transmisă autosomal recesiv caracterizată prin: hipospadias sever perineoscrotal, sac vaginal de dimensiune variabilă deschis fie în sinusul urogenital, fie în uretră, testicule normal dezvoltate cu canalele ejaculatorii deschise în fundul de sac vaginal, pilozitate de tip feminin după pubertate, dar fără dezvoltarea sânilor, absenţa uterului şi a trompelor uterine şi nivel normal al testosteronului. Enzima 5 alpha reductaza 2 este responsabilă de conversia testosterolului în *dihidrotestosteron*, hormon care după cum am precizat controlează dezvoltarea organelor genitale externe şi a sinusului urogenital. În schimb, organele derivate din canalele Wolf, a căror dezvoltare este dependentă de testosteron, au aspect normal.

Anomalii ale receptorului androgenic. Receptorul androgenic face parte din familia receptorilor nucleari, fiind codificat de o genă localizată pe cromosomul X. Mutaţiile acestei gene alterează acţiunea hormonilor androgeni la nivelul organelor ţintă pertrurbând, ca urmare, dezvoltarea fenotipică de tip masculin şi virilizarea.

- **Sindromul de feminizare testiculară completă** (sindromul Morris) este o formă frecventă de pseudohermafroditism masculin (1/20.000 nou născuţi). Este a treia cauză de amenoree primară după sindromul Turmer şi absenţa congenitală a vaginului. Diagnosticul este pus prepubertar datorită identificării unei hernii inghinale care conţine un testicul sau postpubertar datorită amenoreei. Majoritatea cazurilor au aspect feminin normal cu caractere sexuale secundare normale, exceptând reducerea /absenţa pilozităţii axilare şi pubiene (*"femeile manechin"*). Vaginul este închis în fund de sac şi adesea rudimentar iar trompele şi uterul sunt absente, datorită hormonului antimullerian care a fost secretat în cursul vieţii fetale. Testiculii pot fi localizaţi intraabdominal sau inghinal şi trebuie extirpaţi chirurgical datorită riscului de malignizare.
- **Feminizarea testiculară incompletă** este întâlnită mult mai rar. OGE sunt ambigue, cu fuziune parţială labioscrotală şi hipertrofie clitoridiană, la care se adaugă adeseori dezvoltarea incompletă a canalelor Wolf. La pubertate se poate asocia o virilizare accentuată, ceea ce indică efectuarea gonadectomiei prepubertar.
- **Sindromul Reifenstein** este datorat unor mutaţii ale receptorului androgenic[20] care afectează doar parţial funcţia acestor proteine. Ca urmare, predomină fenotipul şi dezvoltarea psihologică de tip masculin, dar cu hipospadias perineoscrotal, ginecomastie frecventă, criptorhidism şi azoospermie.

(3) **Sindromul persistenţei ductelor Müller** este o boală rară întâlnită la indivizi cu gonade şi fenotip de tip masculin, dar care asociază în plus şi prezenţa uterului şi a trompelor uterine, adeseori vestigiale şi situate în canalele inghinale. Afecţiunea, transmisă autosomal recesiv, este determinată de mutaţii fie la nivelul genei care codifică hormonul antimullerian, fie al genei pentru receptorul acestuia, ceea ce afectează regresiunea structurilor derivate din canalele Müller.

c. Defecte în dezvoltarea organelor genitale masculine sunt reprezentate de hipospadias

[20] Există mutaţii ale receptorului androgenic care determină boli ce nu fac parte practic din categoria pseudohermafroditismelor masculine, fiind manifestate doar prin infertilitate sau hipovirilizare la indivizi cu fenotip masculin.

şi criptorhidie.

- **Hipospadiasul** este o anomalie congenitală frecventă (0,5-0,8% din băieţi) în care deschiderea uretrei are loc într-o poziţie anormală pe faţa ventrală, într-un punct situat intermediar între sediul normal şi perineu. În funcţie de poziţia orificiului uretral, hipospadiasul este clasificat în glandular, penian sau perineoscrotal. Adeseori se asociază contracţia şi incurbarea ventrală a penisului (cordee). Deoarece dezvoltarea penisului este dependentă de androgeni, hipospadiasul este considerat a fi rezultatul unor anomalii în formarea sau acţiunea acestora. Cu toate acestea, cauzele cunoscute (boli monogenice, boli cromosomice, ingestia unor droguri în cursul sarcinii) sunt responsabile doar de 25% din cazuri, în restul etiologia fiind necunoscută.
- **Criptorhidismul** (testicului necoborât congenital – TNC)**.** Aproximativ 3% din nou-născuţii la termen şi 30% din nou-născuţii de sex masculin prematuri prezintă cel puţin un testicul necoborât în scrot în momentul naşterii, dar coborârea este adeseori completată în următoarele luni, astfel că la vârsta de un an incidenţa TNC este de circa 0,6 – 0,7%. Deşi au fost identificaţi câţiva factori care controlează descendenţa testiculară, cauzele criptorhidismului sunt încă puţin cunoscute. Cele două complicaţii majore ale criptorhidismului sunt afectarea spermatogenezei şi transformarea malignă.

4. CONDUITA PRACTICĂ ÎN TULBURĂRILE DE SEXUALIZARE

Depistarea unei ambiguităţi sexuale la naştere este o *urgenţă psihosocială*. Problema esenţială pentru medic este un *diagnostic corect, cât mai precoce posibil.* Medicul neonatolog trebuie să recunoască orice *incertitudine* privind „sexul adevărat" al copilului examinând minuţios OGE. Ţinând cont de vârsta gestaţională, el trebuie să fie atent la orice mici modificări în structura genitală, mai ales la hipertrofiile clitoridiene, micropenisul (<2,5 cm) sau testiculii mici, hipospadiasul cu sau fără TNC. În aceste situaţii, ca şi în ambiguităţile sexuale mai pronunţate, neonatologul trebuie să facă un *examen local şi general complet,* evaluând orificiile perineale, mărimea penisului/clitorisului, prezenţa sau absenţa gonadelor în poziţia lor anatomică sau pe traiectul inguinal, prezenţa unor anomalii congenitale asociate. În funcţie de aceste date, care se adugă la *o anamneză corectă a sarcinii şi istoricului familial*, el va recomanda părinţilor să nu stabilească imediat numele copilului; eliberarea certificatului de naştere poate fi întârziată până la stabilirea definitivă a sexului şi, implicit, a numelui ce va fi dat copilului. Cel mai bine ar fi ca pacientul să fie îndrumat către o echipă completă (pediatru, endocrinopediatru, genetican, chirurg pediatru, piholog) şi antrenată în diagnosticul şi managementul stărilor intersexuale.

Analiza cromosomică este primul pas important pentru stabilirea sexului genetic; în această acţiune se vor evalua un număr suficient de metafaze pentru a exclude un mozaic, se va analiza, prin marcaj G sau R şi Q morfologia cromosomului Y şi în unele cazuri se va recurge la FISH, pentru identificarea unor anomalii structurale ale cromosomilor sexuali. Copiii cu cariotip XX pot avea PHF – prin HCS sau forme nonadrenale – sau hermafroditism adevărat (HA); copiii cu cariotip XY – se încadrează în grupul heterogen şi complex al PHM.

În etapele următoare se vor întreprinde *studii imagistice* (US, CT, RMN) – pentru a decela sau nu structuri mulleriene – *hormonale* (17-hidroxiprogesteronul şi steroizii gonadali, în plasmă şi urină) şi *biochimice* (electroliţii serici). Pe baza acestor date se va face un *diagnostic de etapă*, care, în principiu, permite o decizie fermă privind sexul în care va fi crescut copilul (rolul sexual).

Acesta este momentul unei discuţii ample, simple şi lucide (a întregii echipe) cu ambii părinţi, pentru *a se stabili sexul în care va fi declarat şi crescut copilul*. Este un moment dificil în

care se va ţine cont de anxietăţile părinţilor, concepţiile lor religioase, morale şi culturale, precum şi de nivelul de înţelegere. Opţiunea finală va depinde în mare măsură de posibilităţile care există pentru *realizarea unor structuri genitale neambigue şi funcţionale sexual*. O mare importanţă va fi dată (în PHM şi HA) mărimii penisului şi glandului precum şi potenţialului lor de a creşte (după testul cu testosteron parenteral). Celelalte elemente contează mai puţin deoarece chirurgia actuală permite o reconstrucţie corespunzătoare, tratamentul hormonal de substituţie – o sexualizare cvasinormală iar „tratamentul" psihologic – o inserţie socială adecvată.

Decizia informată a părinţilor, înţelegerea şi cooperarea lor sunt decisive pentru stabilirea cu succes a sexului adecvat al pacientului. O dată luată hotărârea de a creşte copilul ca fată sau băiat nu trebuie să mai existe nici o indecizie din partea medicilor sau a părinţilor.

Gama explorărilor se va continua cu *endoscopie şi urogenitografie* (în cazurile cu persistenţa SUG) iar uneori *laparotomie şi biopsie gonadică* (în PHM, HA şi unele cazuri de PHM nonadrenal), *investigaţii hormonale complete*; scopul lor este un diagnostic etiologic cât mai bun cu putinţă.

Echipa de medici va asigura apoi *o îngrijire continuă corespunzătoare* prin care rolul sexual stabilit va fi amplificat de folosirea unor măsuri adecvate de reparare chirurgicală precoce, tratamente hormonale şi susţinere psihologică.

Tot acest scenariu este însă unul normal, perfect, într-o medicină performantă (prin calitatea medicilor şi dotări); din păcate se mai produc uneori erori de diagnostic şi stabilirea a sexului civil adecvat sau diagnostice tardive. Şi în aceste cazuri nefericite, ideal ar fi ca să se facă „o corecţie" şi eventual să se decidă schimbarea sexului până la vârsta de 18 de luni (unii spun pâna la maximum 30 de luni).

INTERNET

1. Asociaţia naţională pentru boli rare (SUA)- NORD : http://www.NORD~rdb.com/~orphan
2. Atlas cu imagini tridimensionale de embriologie umană: http://embryo.soad.umich.edu
3. Biologia dezvoltării (Developmental Biology- Scott F. Gilbert,ediţia 7) - probabil cea mai buna carte in domeniu: http://www.devbio.com
4. Dezvoltarea umana de la conceptie la nastere - imagini si informatii foarte explicite, excelenta pentru studenti, http://www.visembryo.com
5. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : http://geneclinics.org
6. Genecards – bază de date genele umane şi bolile genetice : : http://www.bighost.area.ba.cnr.it/GeneCards
7. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
8. Orphanet – bază de date pentru boli genetice : http://orphanet.infobiogen.fr
9. Programul HELIX (sfat şi teste genetice) al Universităţii şi Spitalului de copii din Washington: http://www.healthlinks.washington.edu/helix/
10. Web site al Universităţii din Michigan: http://www.med.umich.edu/
11. Web site-uri de patologie umană:
    - http://www.emedicine.com,
    - http://www.umm.edu/ency/,
    - http://healthcenters.healthanswers.com/library/MedEnc,
    - http://NetDoctor.co.uk,
    - http://www.icondata.com/health/pedbase,

Bibliografie specifică selectivă

1.Boorman CJ, Shimeld SM – *The evolution of left-right asymmetry in chordates* - Bioessays

2002, 24: 1004-1011.
2.Dubrulle J, Pourquie O – *From head to tail: links between the segmentation clock and antero-posterior patterning of the embryo* – Curr Opin Genet Dev, 2002, 12: 519-523.
3.Eriksson M, Brown WT, Gordon LB et al – *Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome* - *Nature*, 2003, 423: 293-298.
4.Freeman M, Gurdon JB – *Regulatory principles of developmental signaling* - Annu Rev Cell Dev Biol., 2002, 18: 515-539.
5.Goodfellows PN, Camerino G – *DAX-1, an "antitestis" gene* – Cell.Mol.Life.Sci, 1999;55:857-863
6.Hackett BP – *Formation and malformation of the vertebrate left-right axis* – Curr Mol Med. 2002, 2: 39-66.
7.Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y – *Establishment of vertebrate left-right asymetry* - Nat. Rev. Genet., 2002, 3: 103-113.
8.Hiort O., Holterhus P.M. - *The molecular basis of male sexual differentiation* - Eur. J. Endocrinol., 2000;142: 101-110.
9.Huang B et al – *Autosomal XX sex reversal Cosed by duplication os SOX9* – Am.J.Med. Genet 1999;87:349-353
10.Kirkwood TB - *Human senescence* - Bioessays, 1996, 18: 1009-1016.
11.Koopman P. - *SRY and SOX9: mammalian testis-determining genes* - Cell.Mol.Life.Sci 1999;55:839-856
12.Lecuit T, Pilot F - *Developmental control of cell morphogenesis: a focus on membrane growth* - Nat Cell Biol., 2003, 5: 103-108.
13.McElreavey K, Fllous M. - *Sex determination and the X chromosome*- Am. J. Med. Genet., 1999;89: 176-185.
14.Meier P, Finch A, Evan G - *Apoptosis in development* - Nature, 2000; 407: 796-801.
15.Quigley C.A. – *Disorders of Sex Determination and Dif*ferentiation – in "Principles of molecular medecine" – Ed. Jameson J.L. - Humana PressTotowa, New Jersey,1998.
16.Parker KL, Schedl A, Schimmer BP – *Gene interactions in gonadal development* - Annu.Rev.Physiol. 1999;61:417-433.
17.Rodda SJ, Kavanagh SJ, Rathjen J, Rathjen PD - *Embryonic stem cell differentiation and the analysis of mammalian development - Int J Dev Biol.*, 2002, 46: 449-458.
18.Simpson J.L, Rajkovic A. - *Ovarian differentiation and gonadal failure*. Am. J. Med. Genet., 1999;89: 186-200.
19.Srivastava D, Olson EN - *A genetic blueprint for cardiac development* - Nature, 2000, 407: 221-226.
20.Swain A, Lovell-Badge R – *Mammalian sex determination: a molecular drama* - Genes & Development, 1999;13:755-767
21.Tickle C - *Molecular basis of vertebrate limb patterning - Am. J. Med. Genet.* 2002;112: 250-255.
22.Tilmann C., Capel B. - *Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination* - Recent Progress. Horm. Res., 2002;57: 1-18.
23.Troen BR -*The biology of the aging* - Mount Sinai J. Med., 2003, 70: 3-22.
24.Wedlich D - *The polarising role of cell adhesion molecules in early development* - Curr Opin Cell Biol., 2002;14: 563-568.
25.Zaffran S, Frasch M - *Early signals in cardiac development* - Circ. Res. 2002;91: 457-469.

CAPITOLUL 16

GENETICA SISTEMULUI IMUN

A. GENERALITÃŢI DESPRE SISTEMUL IMUN

Rolul sistemul imun, despre care s-a crezut cã ar fi doar acela de a apãra organismul împotriva agenţilor patogeni, este de fapt mult mai complex, bazându-se pe capacitatea de a face distincţie între self (propriu organismului) şi non-self (strãin).

Sistemul imun prezintã douã componente, complet diferite din punct de vedere al percepţiei antigenelor (structuri non-self): sistemul imun nespecific (înnãscut) şi cel specific (adaptativ).

- **Imunitatea înnãscutã** se referã la toate elementele pe care organismul le posedã încã de la naştere şi care trebuie sã reprezinte *prima linie de apãrare* împotriva antigenelor. Aceste elemente includ componente externe şi interne începând de la piele (şi secretiile acide ale glandelor sudoripare şi sebacee), mucoase (şi mucusul care le acoperã), reflexul de tuse şi strãnut, secreţia lacrimalã, mişcarea cililor, creşterea temperaturii corporale, oxigenarea de la nivelul plãmânilor, lizinele eliberate de cãtre microorganismele comensale şi pânã la componentele sistemului complement, fagocitele sau celulele NK (natural killer – celule care rãspund la unele infecţii virale sau prezenţa celulelor tumorale). celulele implicate în fagocitozã sau uciderea extracelularã. Nici una dintre acestea nu ţine cont de tipul antigenului (de specificitatea sa) şi intrã în acţiune *rapid,* într-un timp remarcabil de scurt.
- **Imunitatea adaptativã** (specificã, dobânditã[1]) reprezintã apanajul exclusiv al vertebratelor şi se bazeazã pe existenţa limfocitelor. Rãspunsul acestor celule este mai *lent* şi este *dobândit* doar prin contactul cu antigenul; în plus, rãspunsul este caracteristic, *specific* doar acelui antigen. Acest lucru este posibil datoritã unui fenomen extraordinar care înzestreazã limfocitele cu receptori pentru antigene.

Sistemul imun ar putea fi descris prin prisma funcţiilor sale: **supraveghere** (distincţia self/non-self), **apãrare** (declanşarea unui rãspuns, natural sau dobândit, în scopul eliminãrii sau neutralizãrii antigenului), **reglare** (controlul rãspunsurilor imune prin mecanisme reglatorii în scopul menţinerii homeostaziei sau prevenirii distrugerilor tisulare), **memorie imunologicã** (capacitatea de rãspunde optimizat la un nou contact cu acelaşi antigen) şi **toleranţã** (inducerea unei stãri de neresponsivitate faţã de anumite antigene). O datã declanşat un rãspuns faţã de un antigen (rãspuns imun), vor fi implicate atât imunitatea specificã cât şi cea nespecificã, ca un sistem integrat.

Limfocitele derivã din celulele stem limfoide. În funcţie de locul unde se vor maturiza în continuare (timus sau mãduvã osoasã) vor rezulta limfocite T, respectiv limfocite B. Înainte de a pãrãsi timusul, limfocitele T suferã o diferenţiere suplimentarã în limfocite T helper şi limfocite T citotoxice. Chiar dacã maniera lor de acţiune, precum şi consecinţele sunt foarte diferite, activarea limfocitelor T va conduce la un rãspuns imun denumit **“celular”**. Activarea limfocitelor B va conduce la diferenţierea lor în plasmocite; aceste celule secretã anticorpi,

[1] Acest termen istoric, poate induce o serie de confuzii. Multe dintre componentele sistemului imun dobândit sunt, de asemenea, prezente de la naştere.

molecule capabile să recunoască antigenele (noţiunea de anticorp va fi discutată ulterior). Acest tip de răspuns imun este denumit **"umoral"**. Deşi fiecare tip de răspuns prezintă caracteristici distincte, între ele există o strânsă interdependenţă (figura 16.1).

Practic, noţiunea de **receptor** implică automat noţiunea de **specificitate**: legarea dintre receptor şi ligandul său nu poate fi decât una specifică. Ideea unei astfel de interacţiuni a apărut încă din 1897, o dată cu studiile lui Ehrlich cu privire la legarea dintre toxina difterică şi antitoxina difterică. Paul Ehrlich este cel care avansează "Teoria catenelor laterale" în care se postulează genial nu numai existenţa receptorilor (catene laterale) pentru antigen dar şi caracterul *pre-format* (receptori produşi încă de dinaintea pătrunderii antigenului în organism).

Specificitatea implică faptul că fiecare receptor îşi leagă ligandul său, sau altfel spus, un receptor nu poate fi utilizat decât de un singur ligand. Numărul extrem de mare de structuri care se pot constitui în antigene implică faptul că în interiorul organismului ar trebui să existe un număr corespunzător de receptori pentru aceste antigene. Astfel, numărul de antigene existente în natură (cifra teoretică avansată se ridică la circa 10^9) şi deci al receptorilor pentru antigen care trebuie să existe în mod corespunzător, depăşeşte numărul total al genelor existente în genom. Această constatare se afla în totală contradicţie cu dogma geneticii care postula: *"o genă – o proteină"*.

Contestată tocmai pentru ideea de receptori pre-formaţi, teoria lui Ehrlich a revenit în atenţie datorită probelor experimentale de netăgăduit. Mai întâi, Niels Jerne demonstrează existenţa anticorpilor naturali, cu care organismul se naşte (deci pre-formaţi), iar apoi Burnet, Talmage şi Lederer contribuie la conturarea *"Teoriei selecţiei clonale"*, teorie pe care se bazează întreaga imunologie modernă. Dar dacă receptorii sunt într-adevăr pre-formaţi, înseamnă că *organismul dispune de capacitatea de a produce receptori pentru toate antigenele existente*, inclusiv pentru cele cu care organismul s-ar putea să nu se întâlnească niciodată. Devenea astfel tot mai evident faptul că mecanismul genetic de formare al **receptorilor pentru antigene** este unul cu totul special şi că organismul a elaborat o strategie particulară pentru formarea lor, astfel încât să se poată ajunge la această enormă diversitate, necesară pentru a face faţă întregii game de antigene.

B. MECANISMELE GENETICE CARE STAU LA BAZA GENERĂRII DIVERSITĂŢII IMUNOGLOBULINELOR

Receptorul pentru antigen al **limfocitului B** este molecula de imunoglobulină (Ig). **(**figura 16.2**)** Studiile enzimatice efectuate în anii '60 au condus la elucidarea structurii sale, formată din două lanţuri grele (H – de la *Heavy*) identice şi două lanţuri uşoare identice (L– de la *Light*). Încă de pe atunci devenise evident că cele două capete ale acestei glicoproteine posedă funcţii diferite. Recunoaşterea antigenului este efectuată cu ajutorul capătului amino-terminal, în timp ce capătul carboxi-terminal este implicat în ceea ce denumim funcţii "biologice". Lanţurile au fost împărţite ca atare într-o *porţiune variabilă* (N-terminală) şi o *porţiune constantă* (C-terminală). Fiecare moleculă de imunoglobulină posedă două situsuri identice de legare a antigenului, iar la formarea fiecăruia participă atât partea variabilă a lanţului L cât şi partea variabilă a lanţului H. Astăzi ştim că porţiunea din imunoglobulină dedicată legării antigenului, numită **paratop**, este extrem de redusă ca dimensiuni, fiind alcătuită din doar câţiva aminoacizi, localizaţi în aşa numitele *regiuni hipervariabile*. Nici antigenul nu participă la legare în întregul său, ci cu o porţiune corespunzătoare din punct de vedere dimensional, numită **epitop**.

Adâncirea studiilor de structură a relevat organizarea moleculei în domenii "globulare"», formate din câte două straturi opuse, unite prin intermediul unei legături disulfidice intra-lanţ şi a unei legături hidrofobe (figura 16.3). Fiecare dintre straturi este format dintr-un număr de foi β plisate, antiparalele, unite prin bucle de conexiune. Totodată,

analiza comparativă a unui număr mare de lanţuri a evidenţiat că diferenţele dintre acestea nu se regăsesc dispuse aleatoriu în structura primară a proteinei, ci sunt restrânse la nivelul câtorva porţiuni înguste, numite regiuni hipervariabile. La nivelul domeniului globular, regiunile hipervariabile se regăsesc în regiunea buclelor de conexiune dintre foile β plisate[2].

> În organism este descris un număr mare de molecule care conţin una sau mai multe regiuni homologe cu domeniile globulare ale imunoglobulinelor. Împreună ele alcătuiesc *"superfamilia imunoglobulinelor"*. Cu siguranţă că această formă de organizare a peptidelor reprezintă o manieră de evoluţie către o structură mai stabilă, mai avantajoasă pentru organism. Prezenţa domeniilor globulare în atât de multe molecule diferite sugerează că genele care le codifică s-au format, cel mai probabil, dintr-o genă ancestrală comună, care a fost ulterior multiplicată (şi modificată în acelaşi timp), iar apoi distribuită în genom. Cei mai proeminenţi membri ai superfamiliei imunoglobulinelor (pe lângă imunoglobuline) sunt reprezentaţi de: Igα, Igβ, TCR, lanţurile γ, δ şi ε ale CD3, CD4, CD8, HLA I, HLA II.

Fiecare limfocit B posedă pe suprafaţa sa imunoglobuline cu o specificitate unică, astfel că fiecare limfocit B este capabil să răspundă unui epitop unic. Acest aspect a fost înţeles şi acceptat o dată cu **teoria selecţiei clonale**. Antigenele pătrunse în organism vor *selecta* acele clone de limfocite care au specificităţile potrivite, le vor *activa* şi vor *induce proliferarea* lor. O parte din aceste limfocite se vor diferenţia în **plasmocite**, celule care nu mai exprimă imunoglobuline pe suprafaţă deoarece sintetizează lanţuri grele mai scurte şi sunt astfel incapabile de a mai insera aceste molecule în membrană. În schimb, plasmocitele vor secreta imunoglobulinele, iar această variantă solubilă a receptorului pentru antigen al limfocitului B capătă numele de **anticorp**. Anticorpii sunt şi ei capabili să recunoască antigenele în mod specific şi să se cupleze cu acestea formând complexe antigen-anticorp (**complexe imune**).

Imunoglobulinele reprezintă componentul central al receptorului pentru antigen al limfocitului B (BCR – *B cell receptor*), căruia i se alătură moleculele constante Igα şi Igβ, cu rol în transmiterea intracelulară a semnalului interceptat de receptor **(**figura 16.2**).**

Se estimează că sistemul imun al mamiferelor este capabil să sintetizeze mai mult de *10^{10} imunoglobuline (anticorpi) diferite*[3], un număr imens de molecule, care depăşeşte cu mult numărul de gene pe care genomul uman îl poate pune la dispoziţie. Se pune firesc întrebarea: cum este posibilă sinteza numărului imens de imunoglobuline. O primă teorie (*germ-line theory* – teoria liniei germinale) estima că doar aproximativ 15% dintre genele unui genom haploid sunt alocate codificării imunoglobulinelor, fără să poată oferi însă nici o explicaţie pentru modalitatea formării, cu un număr limitat de gene, a unui număr atât de mare de structuri diferite. Alte teorii ulterioare (*somatic variation theories* – teoriile variaţiei somatice) susţineau că, într-adevăr, din totalul genelor din genom, doar un număr limitat erau alocate sintezei imunoglobulinelor, dar că, prin *recombinări şi mutaţii*, acestea erau capabile să ducă la diversitate. Din păcate însă, nici aceste teorii nu au reuşit să răspundă la întrebarea ridicată de studiile structurale, care au evidenţiat că moleculele de anticorpi manifestă nu numai diversitate la capătul N-terminal dar şi constanţă către capătul C-terminal. Astfel, a apărut pentru prima oară (Dreyer şi Benett, 1965) ideea că există *gene separate pentru regiunea variabilă şi respectiv regiunea constantă*, iar aceste gene reuşesc să fuzioneze formând o secvenţă continuă. Mai mult decât atât, Dreyer şi Benett au intuit ceea ce astăzi este demonstrat şi anume că pentru partea variabilă există disponibile sute de gene, în timp ce pentru partea constantă este necesară doar una.

Au trebuit să treacă însă mai bine de 10 ani pentru ca progresul tehnologic să poată evidenţia (Susumu Tonegawa, 1976) existenţa unor gene separate pentru regiunea variabilă şi

---

[2] Existenţa regiunilor hipervariabile a fost pusă în evidenţă de către Wu şi Kabat în diagramele care le poartă numele. Analiza regiunilor variabile a relevat că, din punct de vedere al structurii primare, diferenţele dintre lanţuri se regăsesc la nivelul unor porţiuni înguste, denumite CDR (complementarity determining region), în timp ce, în afara acestora (regiuni cadru), diferenţele dintre lanţuri nu sunt nici pe departe la fel de marcate.

[3] Totalitatea specificităţilor diferite pe care le poate produce sistemul imun este cunoscută sub numele de *Repertoriu Imunologic*.

constantã, ca şi *rearanjarea genelor* în cursul diferenţierii limfocitelor B. Pe mãsurã ce a devenit posibilã clonarea şi secvenţierea genelor, s-a dovedit cã procesul este şi mai complex.

1. FORMAREA LANŢURILOR UŞOARE

Imunoglobulinele pot utiliza douã tipuri de lanţuri L, denumite kappa (k) şi, respectiv, lambda (λ), în funcţie de partea constantã. Partea constantã şi partea variabilã a lanţurilor uşoare sunt aproximativ egale din punct de vedere al dimensiunii. O moleculã de imunoglobulinã poate folosi fie lanţuri k, fie lanţuri λ (dar nu ambele simultan), fãrã ca aceasta sã afecteze în vreun fel funcţionalitatea receptorului sau a anticorpului.

Fiecare dintre cele douã lanţuri uşoare este codificat de gene distincte, situate pe cromosomi diferiţi: setul de gene care codificã lanţul k este situat pe cromosomul 2 (figura 16.4) iar genele lanţului uşor λ sunt localizate pe cromosomul 22.

Prima opţiune a limfocitului B este reprezentatã întotdeauna de **lanţul uşor k**. Partea variabilã a lanţului k (începând de la capãtul N-terminal) are o lungime de 108 aminoacizi şi este codificatã de douã gene distincte: *gena V* (variabilã) codificã primii 95 de aminoacizi şi *gena J* (*joining* – unire) codificã aminoacizii 96-108.

- Analiza genicã a relevat cã în genomul celulelor germinale umane existã aproximativ *40 de gene V_k diferite*, fiecare dintre ele putând codifica un segment iniţial distinct al domeniului variabil k. Aceste gene variabile sunt aranjate în mod *liniar*, separate prin introni şi precedate (în plus faţã de promotori) de o secvenţã exonicã denumitã Leader (conducãtoare), situatã în aval faţã de promotor şi care va codifica un scurt peptid care are rolul de a introduce şi ghida lanţul ce se sintetizează în reticulul endoplasmatic. Acest peptid leader va fi însã clivat de la nivelul lanţului sintetizat, înainte sã aibã loc asamblarea lanţurilor uşoare şi grele.
- La o oarecare distanţã de grupul genelor V, spre capãtul telomeric al ADN-ului, se gãseşte grupul celor *5 gene J_k*, după care, separatã printr-un intron foarte lung, se gãseşte *singura genã pentru regiunea constantã C_k*, care codificã întreaga porţiune constantã a lanţului k.

Formarea lanţului k începe prin aducerea unei gene V_k şi a unei gene J_k în imediata vecinãtate una faţã de alta, fenomen numit **rearanjare genicã** (figura 16.5). Genele sunt rearanjate şi unite datoritã existenţei la cele douã capete a unor secvenţe intronice denumite RSS (*Recombination Signal Sequences* – secvenţe semnal de recombinare). Procesul este mediat de enzimele codificate de genele RAG-1 şi RAG-2 (*recombination activation genes* – gene de activare a recombinãrii). Aceste enzime acţionează exclusiv la nivelul limfocitelor, iar prezenţa lor simultanã este indispensabilã desfãşurării adecvate a procesului.

În cursul procesului de rearanjare, cele douã gene V şi J, *alese în mod complet aleatoriu*, vor fi unite, dând naştere unei secvenţe genice continue; totodatã, întregul material genetic care se gãsea între cele douã gene va fi excizat şi îndepãrtat. Astfel, ADN-ul limfocitului B care a suferit o rearanjare a genelor lanţului k va conţine urmãtoarele regiuni, începând dinspre centromer cãtre telomer: toate genele V_k de dinaintea celei selectate, promotor-ul şi exonul Leader (L) al genei V_k alese, un intron, segmentul genic continuu V_kJ_k urmat de genele J_k neselectate, un intron şi gena pentru regiunea constantã.

Secvenţa rearanjatã a lanţului uşor este apoi transcrisã de cãtre o ARN-polimerazã, începând de la segmentul L pânã la semnalul stop de dupã gena pentru regiunea constantã, generând astfel un transcript ARN primar. Urmează apoi un proces de incizare a joncţiunilor exon-intron aţe moleculei de ARNm precursor, prin care sunt îndepãrtate secvenţele necodante (matisare) şi un proces de poliadenilare a genei constante. Rezultã astfel ARNm matur care va pãrãsi nucleul şi se va lega ulterior la nivelul ribosomilor. Aici are loc translaţia şi proteina ce se sintetizează va fi dirijatã, de cãtre segmentul Leader de la nivelul capãtului N-terminal, în interiorul lumenului reticulului endoplasmatic rugos (RER). În RER, secvenţa Leader este îndepãrtatã iar lanţul uşor va putea, abia acum, sã se asocieze cu un lanţ greu.

Genele **lanţului uşor λ** sunt situate la om pe cromosomul 22. Locusul λ uman conţine aproximativ 40 de gene V_λ şi 4 gene J_λ despre care se ştie cã sunt funcţionale (pe lângã altele nefuncţionale, numite pseudogene). Organizarea locusului λ este diferitã de cea pentru k, fiecare genã J_λ fiind asociatã cu câte o genã C_λ distinctã. **(**figura 16.4**).** Sinteza lanţului λ este similarã în principiu cu cea a lanţului k: printr-o rearanjare aleatorie, mediatã de RAG1 şi RAG2, o genã V_λ (care codificã primii 97 de aminoacizi) este unitã cu o genã J_λ (care codificã urmãtorii 13 aminoacizi ai regiunii variabile), dar ADN-ul rearanjat va utiliza mai departe acea genã C_λ asociatã genei J alese.

2. FORMAREA LANŢURILOR GRELE

Genele lanţului greu (H) sunt situate la om situate pe cromosomul 14. Organizarea acestor gene este mai complexã decât cea a genelor ce codificã lanţurile uşoare (L) deoarece *existã o genã suplimentarã D,* care codificã o porţiune a regiunii variabile. Astfel, segmentul genic V_H codificã primii 94 de aminoacizi iar segmentul genic J_H – secvenţa curprinsã între aminoacizii 98-113; secvenţa intermediarã, extrem de scurtã (95-97), este codificatã de o genã denumitã D_H (Diversitate) **(**figura 16.4**).** Prin secvenţializarea directã a genelor de pe cromosomul 14, astãzi ştim cã existã, începând de la telomer spre centromer, un grup de 51 de gene V_H, urmate de un grup de 27 de gene D_H, apoi, la o oarecare distanţã, 6 gene J_H funcţionale.

O altã caracteristicã ce particularizeazã genele lanţurilor grele este prezenţa în genomul celulelor germinale a unor *gene multiple ce codificã regiunea constantã.* Partea constantă a lanţului greu este responsabilã pentru conferirea aşa numitelor *funcţii "biologice" ale anticorpilor*, iar conservarea acestor importante funcţii efectorii este realizatã prin menţinerea unui numãr limitat de gene pentru regiunea constantã.

Spre deosebire de partea constantã a lanţurilor uşoare, regiunea situatã spre capãtul C-terminal a lanţurilor grele este cea care hotărăşte încadrarea întregii imunoglobuline într-una din cele 5 clase (**izotip**)[4]. Grupul genelor C_H (fiecare dintre ele este flancată de introni) este separat de genele J_H printr-un intron lung. În plus, fiecare genã C_H este formatã din mai mulţi exoni şi introni. Fiecare dintre exoni codificã câte un domeniu distinct al regiunii constante. Genele regiunii constante sunt aranjate într-o anumitã ordine, iar acest aranjament secvenţial nu este întâmplãtor, fiind în directã legãturã cu ordinea exprimării claselor de imunoglobuline în cursul diferenţierii limfocitului B şi a răspunsului iniţial în IgM la contactul cu un antigen.

Pentru a genera o genã transcriptibilã pentru lanţul greu sunt necesare rearanjări distincte. În aceeaşi manierã întâmplãtoare descrisã anterior, un segment genic D_H oarecare este adus în imediata proximitate a unei gene J_H. Lângã segmentul D_HJ_H care rezultã astfel este adusã una din genele V_H (figura 16.5). Rearanjările de la nivelul ADN-ului cromosomului 14 vor conduce la urmãtoarea succesiune, dinspre telomer cãtre centromer: promotor-ul genei V_H, exonul Leader, un scurt intron, segmentul continuu VDJ, un alt intron şi întreaga serie de gene constante. O datã rearanjările finalizate, o ARN polimerazã se va lega la promotor şi va transcrie întreaga secvenţã (inclusiv intronii). În acest proces de transcripţie sunt antrenate şi *primele douã gene constante,* care sunt C_μ şi C_δ. Rezultã astfel un transcript ARN primar care va urma un proces de matisare şi poliadenilare diferenţiatã. Matisarea ARN-ului va conduce în acest caz nu numai la eliminarea intronilor ci şi la separarea genelor C_μ şi C_δ. Dacã într-o primă etapã, segmentul VDJ va fuziona cu C_μ şi astfel primul lanţ greu sintetizat de limfocitul B va fi un lanţ greu μ (iar prima imunoglobulinã produsã va fi IgM), în etapa imediat urmãtoare, segmentul VDJ se va asocia, într-o manierã cvasialternativã, atât cu gena C_μ cât şi cu gena C_δ. Consecinţa acestui proces particular va fi exprimarea simultanã, pe

[4] Partea constantã a lanţului greu, codificatã de o anumitã genã constantã, permite încadrarea întregii imunoglobuline într-una din cele 5 clase (isotipuri): A, D, E, G, M. De fapt, existã 9 tipuri distincte de lanţuri grele, ceea ce permite distincţia unor clase şi subclase: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, IgA_2, IgM, IgD, IgE.

suprafaţa aceleiaşi celule B, atât a IgM, cât şi a IgD, având însă aceeaşi specificitate, determinată de aceeaşi combinaţie distinctă VDJ.

3. MECANISMUL REARANJĂRILOR GENELOR CARE CODIFICĂ REGIUNEA VARIABILĂ

Rearanjările genelor decurg aşa cum au fost descrise mai sus, dar se pot pune firesc două întrebări: cum este realizată asamblarea corectă (întotdeauna o genă V_H se asociază cu o genă D_H şi nu direct cu gena J_H) şi cum se produce asocierea genelor prin unirea segmentelor genice în ordinea corectă 5'-3', rearanjarea a două gene din acelaşi grup (V, D sau J) veavând loc niciodată. Înţelegerea mecanismului a devenit posibilă o dată cu identificarea a două secvenţe conservate la nivelul ADN-ului din genomul celulelor germinale, fiecare dintre ele constând dintr-un heptamer palindromic şi un nonamer bogat în A şi T, separate de către o secvenţă neconservată, formată fie din 12, fie din 23 de perechi de baze azotate. Lungimea acestor "distanţieri" corespunde fie unei spire, fie a două spire complete a helix-ului ADN. Aceste secvenţe sunt intronice şi se găsesc după fiecare genă V, înaintea fiecărei gene J şi la ambele capete ale genelor D. Intronii descrişi funcţionează ca ţinte de recunoaştere – *secvenţe semnal* – pentru enzimele responsabile pentru rearanjarea genelor şi sunt denumite RSS (*Recombination Signal Sequence*) (figura 16.6).

Rearanjarea genelor este rezultatul acţiunii mai multor enzime, denumite generic "*recombinaze*". Primele astfel de recombinaze responsabile pentru procesele care au loc în limfocite au fost descrise în 1990: genele RAG1 şi RAG2 (*Recombination Activating Gene*) codifică proteine care, doar dacă acţionează împreună, sunt capabile să inducă rearanjarea VDJ sau VJ[5].

Rearanjările genelor V(D)J – destinate părţilor variabile a imunoglobulinelor – pot fi "productive" sau "non-productive". O *rearanjare productivă* este aceea care va conduce la o secvenţă VJ sau VDJ care să poată fi transcrisă şi apoi translată *în întregime*. O *rearanjare neproductivă* decalează cadrul de lectură generând codoni stop care vor bloca translaţia iar celulele vor fi eliminate prin apoptoză. Deşi se consideră că tăierea ADN-ului se face în mod precis la joncţiunea dintre exon şi intronul RSS, procesul ulterior de fuziune a segmentelor genice este adesea imperfect. Această imprecizie reprezintă o sabie cu două tăişuri. Pe de o parte, conferă un imens avantaj limfocitelor, conducând la generarea unui surplus de diversitate, dar, pe de altă parte, poate conduce la rearanjări neproductive.

Limfocitele sunt celule somatice diploide şi conţin deci atât cromosomi materni cât şi paterni. Toate genele implicate în codificarea lanţurilor pentru imunoglobuline (ca şi cele pentru TCR – T cell receptor, receptorul pentru antigen al limfocitului T) sunt *gene dominante*. Cu toate acestea, limfocitelor nu li se permite decât utilizarea alelelor de pe un singur cromosom. Fenomenul (unic limfocitelor), a fost denumit "**excluzie alelică"**. Singura rearanjare care are loc simultan pe ambii cromosomi este cea dintre genele D_H si J_H, toate celelalte desfăşurându-se fie pe un cromosom, fie pe cel pereche. În acest fel, fiecare limfocit va reţine doar câte o rearanjare productivă VDJ şi respectiv VJ, astfel încât vor fi produse lanţuri uşoare şi grele având o parte variabilă identică. Asamblarea lor va conduce în final la obţinerea de receptori pentru antigen cu o specificitate unică.

4. FACTORI CARE CONTRIBUIE LA GENERAREA DIVERSITĂŢII IMUNOGLOBULINELOR

Analizând retrospectiv către primele două teorii emise cu privire la diversitatea receptorilor pentru antigen, teoria liniei germinale şi teoria somatică, constatăm că fiecare

[5] Recombinazele codificate de către RAG1 şi RAG2, alături de enzima TdT (Terminal deoxinucleotidil Transferaza) sunt singurele care se găsesc doar în limfocite.

dintre ele conţine elemente validate ulterior experimental. Prezentăm în continuare o sintezã a mecanismelor care determinã, în ultimã instanţă, obţinerea acestui număr remarcabil de receptori pentru antigene:

(1) În primul rând trebuie remarcat cã, spre deosebire de oricare alte proteine sintetizate în organism, codificarea lanţurilor imunoglobulinelor este asiguratã *de mai multe gene*, care, ulterior, vor fi asamblate într-o secvenţã contiguã.

(2) Fiecare dintre aceste gene este aleasã dintr-un *rezervor genic* alcãtuit din mai multe gene, perfect individualizate. Cel mai bine reprezentat, din acest punct de vedere, este grupul genelor V, destinat atât sintezei lanţurilor grele cât şi a celor uşoare.

(3) Mecanismul cel mai important, care creează el însuşi diversitate şi oferă, în plus, posibilitatea intervenţiei ulterioare a unor mecanisme adiţionale, este reprezentat de *rearanjãrile aleatorii*, guvernate de recombinaze. Faptul cã aceste reasortări genice se produc într-o o manierã întâmplãtoare, fãrã sã existe reguli care sã impunã combinaţii particulare, lasã practic posibilitatea formării oricărei combinaţii de gene[6].

(4) *Paratopul* imunoglobulinelor este format din combinaţia *părţii variabile a unui lanţ greu şi a părţii variabile a unui lanţ uşor*. Asocierea dintre un lanţ greu şi unul uşor este de asemenea *aleatorie*; într-o celulã B oarecare, întâmplarea poate conduce la sinteza unor lanţuri H şi L oarecare, iar acestea, odatã asamblate, vor conduce la o combinaţie particularã[7].

(5) Imprecizia unirii genelor conduce la ceea ce a fost denumitã «*diversitate joncţionalã”* sau “flexibilitate joncţionalã”. Aşa cum menţionam anterior, tãierea dintre RSS şi secvenţa codantã pare sã fie precisã, în schimb, unirea secvenţelor codante este, cel mai adesea, imprecisã. *Joncţiunea genelor* va deveni în acest fel un loc major de generare a diversitãţii, dat fiind faptul cã acest proces este unul practic necontrolabil.

(6) *Regiunea P de adiţie* apare dupã tãierea ADN-ului. Dacã prima clivare apare la joncţiunea RSS-exon, în etapa următoare, nucleotidele de la acest capăt vor face în aşa fel încât, în momentul tãierii complete a ambelor catene, acestea sã fie unite între ele printr-o buclã, aşa numitul “ac de păr”. Fenomenul se produce la capetele ambelor gene care urmează sã fie fuzionate şi, pentru ca unirea acestor gene sã poatã avea loc, “acele de par” trebuie ulterior şi ele tãiate. Aceastã a doua tãiere de cãtre o endonuclează se face, cel mai adesea, asimetric, astfel încât una dintre catene va deveni mai lungã decât cealalaltã. Este necesarã intervenţia unor enzime de reparare care sã adauge nucleotide complementare celor prezente la nivelul catenei mai lungi. Se creează astfel o secvenţã palindromicã la nivelul joncţiunii, motiv pentru care aceastã regiune a fost denumitã “*regiune P de adiţie”*.

(7) *Regiunea N de adiţie* este creatã cu ajutorul unei enzime numite TdT (*terminal deoxinucleotidil transferase*). Rolul TdT este acela de a adăuga nucleotide la capetele genei D în cursul unirii acesteia la gena J sau la gena V. Numărul maxim de baze azotate pe care enzima le poate alipi genei D este de 15, dar numărul de nucleotide transferat este aleatoriu şi astfel se formează secvenţe complet diferite. Ceea ce este important de subliniat în acest moment este cã *diversitatea joncţională*, adiţia în regiunea P şi în regiunea N conduc la apariţia unor secvenţe genice complet noi, care nu existau iniţial în genomul celulelor germinale. Aceste mecanisme sunt cele care reuşesc sã ridice diversitatea Ig pânã la cifra avansatã anterior, de aproximativ 10^{10} specificităţi diferite.

---

[6] Un calcul simplu ne aratã cã în cazul lanţurilor grele, dacã orice gena D se poate combina cu orice gena J şi apoi cu orice genã V, numărul de combinaţii posibile pe care îl putem obţine este de $51(V_H)$ x $27(D_H)$ x $6(J_H)$ = 8262. În cazul lanţurilor uşoare de tip k, calculul ne conduce la $40(V_k)$ x $5(J_k)$ = 200 de combinaţii, respectiv $30(V_\lambda)$ x $4(J_\lambda)$ = 120 de combinaţii pentru lanţurile uşoare λ.

[7] Astfel, un calcul simplu ne aratã cã putem obţine, în cazul asocierii unui lanţ greu cu un lanţ uşor k un număr de 8262 x 200 = 1 652 400 de variante. Această sumă, deşi impresionantă, este totuşi departe de numărul de specificităţi existente în organism, care alcătuiesc repertoriul imunologic şi care este estimat între 10^{10} şi 10^{11}. Surplusul de diversitate este oferit însă de *mecanisme suplimentare*, care nu s-ar fi putut, totuşi, manifesta în absenţa acestui sistem cu totul deosebit prin care gene, situate la distanţă între ele, sunt alese întâmplător, alăturate şi unite pentru a forma o genă hibrid.

(8) Un alt mecanism implicat în generarea diversităţii este constituit de *mutaţiile somatice* ce se produc întâmplător, printr-un mecanism încă neelucidat, la nivelul genelor rearanjate (VJ sau VDJ). Un element deosebit este reprezentat de *frecvenţa crescută* (hipermutaţii) cu care aceste mutaţii apar, de cel puţin o sută de mii de ori mai înaltă decât frecvenţa cu care apar mutaţiile spontane la nivelul oricăror alte gene[8]

5. ASOCIEREA GENEI CONSTANTE ŞI COMUTAREA DE CLASĂ

Organizarea genelor ce codifică partea constantă a lanţurilor este diferită de cea responsabilă pentru partea variabilă. În cazul lanţurilor uşoare, există o singură genă C_k şi mai multe gene C_λ, dar partea constantă a lanţurilor uşoare nu influenţează nici paratopul şi nici clasa imunoglobulinei respective. De mult mai mare importanţă este însă partea constantă a lanţurilor grele, responsabilă pentru determinarea **izotipului** şi a funcţiilor numite "biologice" ale anticorpilor. Genele pentru regiunile constante sunt mult mai lungi decât cele pentru regiunile variabile, fiind alcătuite dintr-o serie de exoni distincţi ce codifică fiecare în parte domeniile extracelulare, regiunea "balama" (acolo unde este cazul), domeniul transmembranar şi coada intracitoplasmatică.

O caracteristică a genelor C_H este prezenţa unor gene multiple în genomul celulelor germinale, corespunzătoare fiecărei clase şi subclase de imunoglobuline. Ultima genă J_H este separată de prima genă C_H printr-un intron foarte lung. În plus, fiecare genă C_H este precedată nu numai de promotor, dar şi de un *amplificator* al transcripţiei (enhancer) precum şi de câte o secvenţă intronică denumită "switch" (comutare), caracteristică fiecărei gene în parte; o excepţie notabilă este reprezentată de gena C_δ, lipsită de secvenţa de comutare. Secvenţele de comutare sunt destul de lungi, fiind alcătuite din mai multe motive repetitive. Rolul acestor introni este acela de a permite asocierea la acest nivel a unor recombinaze care sunt diferite pentru fiecare clasă în parte.

În timpul diferenţierii limfocitului B, genele C_μ şi C_δ, cele mai apropiate de genele J, sunt primele transcrise. Ca un element particular, ambele gene sunt transcrise simultan, probabil tocmai datorită absenţei secvenţei de comutare din faţa genei C_δ, precum şi a distanţei de numai 5 kb dintre cele două gene. Astfel, transcriptul primar, cu o lungime de aproximativ 15 kb, conţine genele $VDJC_\mu C_\delta$. Dintre cele patru situsuri de poliadenilare, primele două sunt asociate genei C_μ, iar celelalte două genei C_δ. Dacă transcriptul primar este clivat şi poliadenilarea are loc la nivelul situsului 2, atunci ARN-ul mesager va conţine întreaga secvenţă a genei C_μ şi va rezulta astfel forma membranară a lanţului. Dacă însă poliadenilarea se face la nivelul situsului 4, atunci, prin tăierea ARN-ului, secvenţa C_μ va fi înlăturată şi se va ajunge la ARNm care codifică forma membranară a lanţului C_δ. Acest proces se produce simultan, astfel că secvenţa VDJ are posibilitatea să se unească, de o manieră alternativă şi cu gena C_μ şi cu gena C_δ. În consecinţă, limfocitele B mature dar *naive* vor exprima simultan pe suprafaţă atât IgM cât şi IgD, dar cu aceeaşi specificitate, determinată de către aceeaşi combinaţie VDJ.

După stimularea antigenică însă, expresia IgD este pierdută, iar IgM tinde să fie înlocuită, în cele mai multe cazuri, cu un alt isotip, fenomen denumit "**comutare de clasă"**. Astfel, gena C_μ va fi înlocuită cu o alta, situată spre capătul 3' al ADN-ului. Trebuie subliniat însă că acest proces are loc în timpul vieţii adulte a limfocitului B, noi rearanjări genice ne

[8] Se pare că anumite motive nucleotidice şi secvenţe palindromice de la nivelul genelor rearanjate (VJ sau VDJ) sunt în mod particular susceptibile în faţa acestui mecanism, în limfocitele B mature fiind afectate preferenţial acele secvenţe care codifică regiunile hipervariabile (CDR). În mod normal, hipermutaţiile somatice au loc în centrul germinal (deci în organele limfoide secundare), ca o consecinţă a expunerii la antigen; acele limfocite B care au receptorul cu cea mai mare afinitate pentru antigenul respectiv vor fi selectate în mod preferenţial, vor supravieţui şi tot dintre acestea se vor diferenţia şi celulele cu memorie. Procesul a fost denumit "*maturaţie de afinitate"*.

mai fiind posibile; o datã ce limfocitul a ajuns la o anumitã reasortare productivã, aceasta va deveni permanentã pentru celula în cauzã. Astfel, comutarea de clasã nu influenţează specificitatea imunoglobulinei respective (figura 16.7).

De asemenea, trebuie precizat cã procesul de comutare de clasã are loc în contextul unui rãspuns imun faţã de un antigen T-dependent, cu alte cuvinte, un rãspuns imun în care sunt implicate şi limfocitele T helper, prin intermediul anumitor seturi de citokine şi molecule de suprafaţã[9].

În cazul în care limfocitul B s-a diferenţiat în plasmocit, sinteza imunoglobulinelor de suprafaţã este înlocuitã cu cea de **anticorpi**. Diferenţa nu se regãseşte la partea variabilã (în mod esenţial, specificitatea anticorpilor este aceeaşi cu a imunoglobulinelor de pe suprafaţa limfocitelor B stimulate iniţial) ci la nivelul secvenţei situatã spre capãtul C-terminal al pãrţii constante. Posibilitatea sintezei unei forme sau a alteia se datoreazã existenţei unor exoni suplimentari, denumiţi M1 şi M2, localizaţi în aval de exonul responsabil pentru ultimul domeniu extracelular constant. Exonul M1 codificã porţiunea transmembranarã, iar M2 porţiunea intracitoplasmaticã. Dacã poliadenilarea se produce la nivelul situsului 1 de la nivelul transcriptului primar, atunci exonii M1 şi M2 sunt pierduţi şi se va ajunge la forma secretatã a lanţului greu respectiv

În concluzie, formarea imunoglobulinelor este consecinţa unui proces genetic absolut distinct, unic receptorilor pentru antigene, cu o mulţime de excepţii de la regulã. Astfel, un singur peptid va trebui codificat de mai multe gene, iar elementul principal al întregului proces este reprezentat de rearanjarea la întâmplare a mai multor gene destinate regiunii variabile. În plus, genele care codificã regiunile constante sunt fuzionate doar la nivel de ARN, ceea ce va crea premizele asocierii alternative ale genelor Cμ si Cδ, într-o primã instanţã şi apoi ale comutãrii de clasã. În ciuda faptului cã genele implicate în formarea imunoglobulinelor sunt dominante, datoritã excluziei alelice vor putea fi exprimate doar alele de pe un cromosom sau altul.

C. MECANISMELE GENETICE CARE STAU LA BAZA GENERÃRII DIVERSITÃŢII TCR

Între imunoglobuline şi receptorul pentru antigen al celulei T (TCR) existã multe asemãnãri din punct de vedere structural. Domeniile extracelulare care alcãtuiesc cele douã lanţuri sunt, ca şi la Ig, constante şi variabile, întreaga porţiune extracelularã a TCR seamãnã cu fragmentul Fab al anticorpilor[10], iar componenta care asigurã recunoaşterea este asociatã cu molecula constantã CD3 (analogã Igα şi Igβ, cu rol în transmiterea intracelularã a semnalului) (figura 16.8).

Mecanismul formãrii receptorului pentru antigen al limfocitelor T prezintã foarte multe aspecte extrem de asemãnãtoare cu cel al formãrii imunoglobulinelor, implicând, în esenţã, rearanjãri genice V(D)J şi diversitate joncţionalã. Analiza lanţurilor TCR demonstreazã de asemenea existenţa regiunilor hipervariabile, responsabile pentru formarea efectivã a situsului de interacţiune al receptorului.

Din aceste motive, am ales sã ne concentrãm în special asupra diferenţelor de formare a celor douã categorii de receptori. O primã deosebire notabilã este reprezentatã de existenţa a douã tipuri de TCR: TCR 1 (γδ) şi TCR 2 (αβ). Indiferent de tipul de TCR, acesta este asociat la nivel transmembranar, prin legãturi electrostatice, cu aceeaşi moleculã CD3.

---

[9] Rãspunsul faţã de antigenele T independente, în absenţa intervenţiei limfocitelor T helper, nu conduce nici la memorie imunologicã şi nici la comutare de clasã.

[10] Domeniul C_α nu este organizat ca un domeniu globular. Conformaţia TCR pare sa fie mai rigidã decât a Ig datoritã interacţiunilor dintre domeniile fiecãrui lanţ, posibil şi datoritã diferenţei dintre sistemul de recunoaştere a Ag propriu al fiecãrui receptor.

Există 4 familii de gene la nivelul ADN-ului din genomul celulelor germinale, dedicate câte unui anumit tip de lanţ (figura 16.9). Genele care codifică lanţurile α şi δ sunt grupate pe cromosomul 14 (în altă regiune decât genele pentru lanţul greu al imunoglobulinelor), iar genele lanţurilor β şi γ pe cromosomul 7. Localizarea particulară a genelor δ nu este întâmplătoare. Atunci când celula reuşeşte să ajungă la o rearanjare productivă a genelor pentru lanţul α, genele lanţului δ sunt deletate; astfel, la nivelul unui anumit limfocit T, nu poate exista o exprimare simultană de TCR αβ şi TCR γδ.

Reasortarea genelor se face sub influenţa enzimelor codificate de aceleaşi RAG1 şi RAG2, sistemul de recunoaştere a genelor este reprezentat de aceeaşi secvenţă heptamer/distanţier/nonamer, fuziunea secvenţelor genice conduce la imprecizie joncţională, la care se adaugă imprecizia inserţională. Existenţa mai multor gene D sau J, grupate distinct, poate conduce la unele diferenţe de rearanjare[11]. *Repertoriul TCR* este, se pare, cel puţin la fel de mare ca şi al imunogloblinelor, mai ales datorită unei enorme variabilităţi joncţionale şi inserţionale (regiune N de adiţie, regiune P de adiţie). Aceleaşi mecanisme reprezintă, în acelaşi timp, şi un factor de risc, putând conduce la rearanjări neproductive care fie fac produsul nefuncţional, fie fac ca secvenţa de ADN să nu mai poată fi citită (introducerea unor codoni stop).

O diferenţă importantă între procesele de formare ale celor doi receptori este aceea că, în urma activării antigenice, genele TCR nu suferă hipermutaţii somatice. Absenţa mutaţiilor întâmplătoare reprezintă o măsură de siguranţă împotriva apariţiei limfocitelor autoreactive, cu atât mai importantă cu cât limfocitele T au un sistem de recunoaştere particular, care vizează nu doar antigenul - non-self - ci şi molecula de MHC (Major Histocompatibility Complex – Complex Major de Histocompatibilitate) –self - care prezintă acest antigen.

Formarea TCR începe în corticala timusului, într-o etapă de dezvoltare a timocitelor[12] în care acestea şi-au dobândit capacitatea exprimării moleculei CD3, enzima TdT este de asemenea prezentă, dar nici una dintre moleculele co-receptor (CD4 şi CD8) nu au apărut încă – motiv pentru care celulele sunt denumite dublu negative (DN).

Primele gene care încep să se rearanjeze, mai mult sau mai puţin simultan, sunt cele pentru lanţurile β şi γ. Dacă genele γ suferă o reasortare productivă, începe şi rearanjarea genelor δ. Dacă atât genele pentru lanţurile γ cât şi cele pentru lanţurile δ sunt rearanjate productiv, cu alte cuvinte transcripţia poate avea loc şi poate începe sinteza lanţurilor, alte rearanjări nu vor mai avea loc şi acele timocite vor rămâne γδ şi se vor dezvolta, pe o cale diferită, în celule DN, CD3+ γδ. Acestea vor reprezenta aproximativ 5% din totalul timocitelor la adult.

Majoritatea timocitelor dublu negative aleg însă o altă cale de dezvoltare. Dacă rearanjările γ şi/sau δ nu sunt funcţionale, vor continua rearanjările β. O dată ce celula a ajuns la o rearanjare TCRβ productivă sunt suprimate alte rearanjări ale lanţurilor β-TCR (componentă a fenomenului de excluzie alelică). Astfel sunt selectate acele timocite care exprimă lanţul β pentru o expansiune şi maturare ulterioară. Din acest moment, pot fi declanşate rearanjările pentru lanţul α, iar acele timocite care vor ajunge la rearanjări productive vor fi capabile să exprime pe suprafaţă un TCR αβ complet format, chiar dacă la nivele scăzute. Timocitele sunt în continuare dublu pozitive şi se găsesc la nivelul corticalei profunde a timusului. De aici încolo, aceste celule vor suferi o serie de procese complexe, cunoscute sub numele de selecţie pozitivă şi negativă.

Selecţia pozitivă are loc la nivelul corticalei profunde, sub influenţa celulelor epiteliale corticale. Acele timocite care sunt capabile să recunoască prin intermediul TCR-ului moleculele MHC (cu o afinitate medie) sunt selectate pozitiv, vor supravieţui şi vor primi

---

[11] Astfel, dacă în cazul genelor lanţului β este aleasă gena D_2, aceasta se va putea asocia doar cu o genă J din al doilea grup. Dacă este aleasă însă gena D_1, rearanjarea va putea asocia, într-o manieră aleatorie, fie o genă J din primul grup, fie din al doilea.

[12] Limfocitele T din timus, aflate în plin proces de diferenţiere, sunt denumite timocite.

semnale care le vor determina să prolifereze. Consecinţa acestui fenomen este ceea ce se numeşte ”restricţie MHC”, sau, cu alte cuvinte, capacitatea limfocitelor T de a recunoaşte antigenul doar în contextul moleculelor MHC proprii organismului respectiv. Celulele care nu corespund acestui criteriu sunt eliminate prin apoptozã.

Excluzia alelică funcţionează cu maximã stricteţe în cazul formării imunoglobulinelor. În cazul TCR-ului însã, dacã pentru lanţul β excluzia alelica pare sã reprezinte regula, în cazul lanţurilor α este mai puţin strictã. În cazul în care se produc rearanjări productive pe ambii cromosomi, cele douã lanţuri α diferite vor conduce la existenţa simultanã a douã TCR-uri cu specificitãţi antigenice diferite. Deşi nu existã un consens asupra numărului de astfel de limfocite T mature circulante, se pare cã în astfel de situaţii doar unul dintre cei doi receptori reuşeşte sã treacã de procesele de selecţie (în special de selecţia pozitivã şi ca urmare sã fie MHC-limitat).

Numărul celulelor care posedã un receptor corespunzãtor din acest punct de vedere este mic şi, ca urmare, o serie din celulele care nu au fost selectate pozitiv au posibilitatea sã îşi *reia rearanjãrile* pentru lanţul α. Dacã noua rearanjare va fi productivã, existã potenţialul de a conduce la o nouã specificitate. Acest fenomen este denumit “editare” iar timocitul cãruia i se oferã aceastã şansã va trebui sã treacã din nou prin procesul de selecţie pozitivã.

La nivelul joncţiunii cortico-medulare, unde se gãsesc celule cu origine hematogenã (macrofage şi celule dendritice) şi mai departe în corticala medularã, sub influenţa celulelor epiteliale de la acest nivel, are loc procesul de **selecţie negativã**[13]. Eliminarea prin procesul de selecţie negativã a timocitelor care poartã receptori de mare afinitate pentru molecule MHC self singure sau pentru antigenul self prezentate de MHC, conduce la toleranţã faţã de self. Deoarece procesul are loc în timus, este denumit **toleranţã centralã**. Sunt astfel practic eliminate fizic un numãr important de limfocite autoreactive[14].

Recunoaşterea unui tip de MHC sau altul are o consecinţã suplimentarã: acele timocite care au recunoscut un MHC I se vor diferenţia în continuare în **limfocite T citotoxice** (CD8+ CD4-), iar cele care au recunoscut MHC II se vor diferenţia în **limfocite T helper** (CD4+ CD8-).

D. COMPLEXUL MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE

Complexul major de histocompatibilitate (MHC) este un sistem multigenic şi polimorfic, situat pe braţul scurt al cromosomului 6, cu rol fundamental în activarea şi reglarea răspunsul imun. Rolul proteinelor codificate de genele MHC, în special al celor exprimate ca molecule membranare, a fost pus iniţial în legãturã cu rejetul grefelor, de unde şi numele de “histocompatibilitate” atribuit de cãtre George Snell (premiul Nobel în 1980)[15].

1. GENELE MHC

CMH se întinde pe o lungime de aproximativ 2-3 centimorgani (aproximativ 4 x 10^6 kilobaze), în interiorul cãreia au fost identificate peste 300 de gene (figura 16.10). Pe baza diferenţelor structurale şi funcţionale genele ce alcătuiesc CMH sunt împărţite în trei categorii; două dintre acestea, genele de clasă I şi de clasă II, conţin gene ce codifică *antigenele leucocitare umane (HLA)*, molecule situate pe suprafaţa celulară care joacă un rol important în iniţiera răspunsului imun, prin prezentarea antigenelor limfocitelor T helper

[13] Selecţia pozitivã a limfocitului B are altã semnificaţie (exprimarea unui receptor intermediar); selecţia negativã se referã însã de asemenea la eliminarea limfocitelor B autoreactive

[14] Acest proces nu este perfect; va continua în periferie, dar aici vor fi implicate mai degrabă alte mecanisme decât inducerea apoptozei celulelor.

[15] În afarã de complexul major, exista şi un grup denumit minor (mHC), a cărui importanţă a devenit evidentã în contextul supravieţuirii pe termen lung a organelor grefate.

$CD4^+$ şi limfocitelor T citotoxice $CD8^+$, care nu pot recunoaşte antigenul dacă acesta nu este asociat cu o moleculă HLA pe suprafaţa celulelor prezentatoare de antigen. Deci, moleculele HLA sunt implicate în recunoaşterea antigenului, interacţiunile dintre limfocite, dezvoltarea toleranţei la self şi rejetul transplantelor. A treia categorie de gene MHC nu sunt gene HLA şi codifică alte proteine.

a) Genele de clasă I sunt reprezentate de genele HLA clasice: HLA-A, HLA-B şi HLA-C, care codifică molecule (antigene) de clasă I exprimate pe membrana tuturor celulelor nucleate. Fiecare din aceste gene prezintă, în populaţie, mai multe alele. În acord cu O.M.S., în nomenclatura lor este identificat mai întâi locusul, urmat de numărul de identificare al alelei, eventual de un număr care să indice subtipul: de exemplu HLA-A*0201.

În afară de genele HLA I clasice, există o mulţime de gene ce codifică pentru produşi "non-clasici", denumite la om HLA-E, F, G, H, J şi X, la care se adaugă o familie recent descoperită, denumită MIC (MHC I chain-related): A, B, C, D, E.

Moleculele (antigenele) de clasă I sunt alcătuite din două subunităţi polipeptidice: lanţurile α polimorfice (codificate de genele HLA) şi un polipeptid nepolimorfic, β_2 microglobulina (codificată de o genă situată pe cromosomul 15) (figura 16.11).

Lanţul α este format din trei domenii extracelulare (α_1, α_2 şi α_3), un domeniu transmembranar şi un domeniu intracitoplasmatic, fiecare dintre acestea fiind codificate de exoni distincţi. β_2 microgobulina interacţionează cu toate domeniile extracelulare ale lanţului α, fiind un element esenţial pentru plierea corectă a acestuia şi stabilitatea sa structurală. Domeniile α_1 şi α_2 reprezintă domeniile *variabile* ale moleculei şi participă la formarea unei structuri speciale, care are forma unei "cupe", formată dintr-un planşeu alcătuit din 8 foi β plisate antiparalele şi 2 margini sub formă de α helix-uri (figura 16.12). Funcţia cupei este aceea de a prezenta peptide antigenice limfocitelor T citotoxice – CTL).

Proteinele endogene sunt degradate de o protează endogenă (LMP) în fragmente peptidice care apoi sunt transportate de către un transportor special (TAP) la suprafaţa celulei şi fixate de molecule de clasa I care prezintă peptidul antigenic limfocitelor Tc (CTL) (figura 16-13).

b) Genele de clasă II sunt grupate în câteva subregiuni care codifică antigene de suprafaţă celulară – *HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR.* În general, fiecare subregiune conţine una sau mai multe gene α şi β pentru lanţurile corespunzătoare ale moleculelor HLA de clasă II, exprimate de obicei în macrofage, limfocitele B, limfocitele T activate, dar în anumite condiţii şi de către alte tipuri celulare. În afară de genele HLA II clasice au fost identificate, atât la om cât şi la şoarece, **gene HLA II non-clasice** (HLA-DM, DN, DO). Funcţia acestor produşi este de reglare a moleculelor clasice. Tot în regiunea HLA II a fost identificată prezenţa **genelor LMP2 şi LMP7** - care codifică două dintre subunităţile proteasomului (cu rol în procesarea proteinelor endogene), a **genelor TAP1, TAP2, DM** care codifică subunităţi ale transportorului de peptide antigenice.

Moleculele HLA de clasă II sunt heterodimeri glicoproteici membranari, alcătuiţi dintr-un lanţ α şi un lanţ β (figura 16.11), ambele fiind codificate de gene care aparţin complexului genic HLA.

Lanţurile sunt asociate între ele necovalent, fiecare fiind alcătuit din câte 2 domenii extracelulare (α_1 şi α_2, β_1 şi β_2), un domeniu transmembranar şi unul intracelular. Domeniile α_1 şi β_1 reprezintă domeniile *variabile* ale moleculei şi, împreună, participă la formarea unei cupe asemănătoare celei a moleculei HLA I. Moleculele de clasă II sunt sintetizate în reticulul endoplasmic şi apoi eliberate în endosomi; ele au fixată o proteină Ii care este îndepărtată (de către proteina DM) pentru a fixa peptidul antigenic, produs în endosomi prin digestia antigenelor exogene (figura 14-2 Thompson). Moleculele de clasă II sunt apoi exprimate pe suprafaţa celulelor implicate în răspunsul imun pentru a prezenta peptidul antigenic limfocitelor T helper

c) Genele de clasă III nu sunt gene HLA; unele dintre ele codifică proteine serice şi receptori membranari implicaţi în funcţia imună (factorul Bf, proteinele complementului C2 şi C4); altele au funcţii heterogene (gene ce codifică proteine de şoc termic, factori de necrozã tumoralã – TNF_α şi TNF_β, gena pentru 21-hodroxilază, implicată în *hiperplazia congenitală de suprarenală* sau gena HFE ce produce, prin mutaţie, *hemocromatoza ereditară*)

2. PROPRIETĂŢILE ŞI FUNCŢIILE SISTEMULUI HLA

a) Proprietăţile sistemului HLA.

Caracteristicile distinctive ale sistemului HLA sunt reprezentate de:

- polimorfism,
- codominanţă,
- transmiterea strâns înlănţuită (în bloc, ca un haplotip) de la părinţi la descendenţi,
- asocierea preferenţială.

Poate cel mai remarcabil aspect al al genelor HLA este **polimorfismul** lor înalt, adicã existenţa a multiple alele pentru un anumit locus.

Aceste alele diferă, la nivelul secvenţei ADN, cu procente cuprinse în medie între 5 şi 10% şi, ca urmare, produşii genelor exprimaţi de diferiţi indivizi prezintă diferenţe structurale unice. Nu întâmplător, aceste diferenţe se regăsesc în special la nivelul domeniilor variabile, implicate în formarea cupelor şi astfel în legarea antigenului. Sursa diversităţii moleculelor HLA este diferită de cea a moleculelor de imunoglobuline sau TCR, mecanismele care conduc la obţinerea polimorfismului, a acestui număr impresionant de variante alelice pentru genele HLA, fiind dintre cele mai diverse: mutaţii punctiforme, recombinări genetice, conversii genice, crossing-over homolog dar inegal etc.

Sistemul HLA posedă un număr absolut remarcabil de alele diferite pentru aproape fiecare dintre locii enumeraţi anterior. Cu siguranţă este cel mai polimorfic complex genetic cunoscut la vertebrate. Până în prezent, analiza moleculelor HLA I a revelat 133 de alele pentru HLA-A, 277 de alele pentru HLA-B şi 77 de alele pentru HLA-C. Moleculele HLA II sunt la fel de polimorfice, pentru lanţurile DRβ fiind raportate până în prezent 222 de alele. În plus, există 9 gene distincte DRβ, iar un individ poate să posede un număr variabil (cuprins între 2 şi 5) de astfel de gene. Frecvenţa acestor alele diferă în funcţie de grupul etnic şi localizarea geografică a populaţiei. Cu siguranţă că cifrele pe care le avem astăzi la dispoziţie cu privire la polimorfismul genelor HLA reprezintă subestimari şi, o dată cu trecerea pe scară largă la secvenţierea genelor, vor fi caracterizate multe alte alele.

Conform calculelor bazate pe cifrele pe care le avem la dispoziţie în prezent, numărul de combinaţii astfel posibile (diversitatea teoretică) este de circa 10^{12}. Acest calcul se bazează însă doar pe numărul incomplet de alele cunoscut până în prezent, astfel că diversitatea teoretică reală este mult mai mare. Pe de altă parte însă, diversitatea observată în realitate este mai mică. Faptul că nu se manifestă o distribuţie chiar întâmplătoare şi că anumite combinaţii de alele apar mai frecvent decât ar rezulta din calculul probabilităţilor a condus la noţiunea de asociere preferenţială sau "**dezechilibru de înlănţuire**". De exemplu, frecvenţa cu care gena HLA-A1 apare în populaţia caucaziană este de 16%, iar a genei B8 este de 10%. Conform calculului teoretic, frecvenţa asocierii HLA-A1 cu HLA-B8 ar trebui să fie de 16% x 10%, adică de 1,6% ; totuşi, datorită dezechilibrului, frecvenţa A1 + B8 este de 8,8%.

În ciuda acestui fenomen, care restrânge diversitatea teoretică, numărul de combinaţii posibile care pot rezulta ca urmare a exprimării diverselor alele HLA rămâne enorm, ceea ce face să nu existe două persoane identice (excepţie făcând gemenii monozigoţi); genele HLA reprezintă un "*veritabil buletin molecular de identitate*". Astfel, moleculele HLA reprezintă una dintre cele mai serioase bariere în calea efectuării unui alotransplant (între membri diferiţi ai aceleiaşi specii).

Toate genele HLA, indiferent de varianta alelică, sunt **dominante**, iar exprimarea lor este **codominantă**, deci ambele gene alele de pe cromosomii omologi se exprimă pe suprafaţa celulelor. Deşi acest tip de exprimare este cel normal, este important de subliniat că exprimarea simultană a alelelor prezente pe cromosomii omologi reprezintă o importantă diferenţa faţă de excluzia alelică ce apare în cazul genelor Ig şi ale TCR. Mai mult decât atât, unele celule (cum ar fi limfocitele de exemplu) încearcă să exprime cât mai multe tipuri de molecule HLA, astfel că, per ansamblul organismului, avem de a face cu un set complet de molecule, expresie a tuturor genelor din complexul major de histocompatibilitate.

O altă proprietate a genelor ce alcătuiesc sistemul HLA este înlănţuirea strânsă şi *transmiterea în bloc* de la părinţi la copii a genelor alele ce formează pe fiecare cromosom 6 un anumit **haplotip**. Notând haplotipurile parentale, corespunzătoare celor doi cromosomi 6

omologi, cu **a b** şi **c d** la copii sunt posibile următoarele combinaţii genotipice (fiecare părinte transmite, prin gameţi, unul din cele două haplotipuri): **a c, a d, b c** şi **b d**– fiecare cu o probabilitate de 25%. De aici rezultă că fiecare dintre copii va fi semi identic cu fiecare dintre părinţi iar în fratrie există probabilitatea teoretică ca fraţii şi surorile să fie: semi identici (50%), identici (25%), diferiţi (25%) (figura 16.14).

b) Funcţiile sistemului HLA

Moleculele HLA au fost identificate iniţial ca urmare a rolului lor în respingerea grefelor. Acestea erau rejetate în primul rând datoritã rãspunsului limfocitelor T faţã de moleculele HLA străine. În ciuda contextului în care au fost descoperite, *funcţia primordialã a moleculelor HLA este aceea de a prezenta antigenele limfocitelor T.*

Chiar dacã sunt implicate în legarea antigenului, interacţiunea HLA-peptid antigenic nu este una strict specificã, aşa cum este cea dintre Ig/TCR şi antigen. S-a demonstrat, de exemplu, cã douã variante alelice diferite ale aceleiaşi molecule HLA I pot prezenta mai mult de 2000 de peptide diferite; în plus, fiecare tip de moleculã HLA leagã un set diferit de peptide. În aceastã manierã pot fi prezentate simultan pe suprafaţa celulei respective un numãr enorm de peptide antigenice diferite şi activate astfel un numãr corespunzãtor de limfocite T diferite.

Posibilitatea sau imposibilitatea prezentării unui anumit antigen dictează astfel răspunsul faţă de acesta şi, ca urmare, rezistenţa sau susceptibilitatea la boală. Deci diferite haplotipuri HLA au o eficienţă diferită în inducţia răspunsului imun la diferiţi antigeni.Aceasta ar explica de ce *puterea de apărare a fiecărui organism la diferite agresiuni ale patogenilor este diferită de la o persoană la alta.*

Prin interacţiunea directã cu TCR şi moleculele co-receptor (CD4 şi CD8), moleculele HLA sunt o componentã importantã în *activarea limfocitelor T* şi astfel în *reglarea şi desfăşurarea răspunsului imun*. Celulele prezentatoare de antigen captează, procesează şi apoi prezintă peptide antigenice pe suprafaţa lor, asociate moleculelor HLA de clasă II. Limfocitele Th recunosc antigenul prezentat în aceasta manieră şi se activează, ceea ce conduce la proliferarea şi diferenţierea lor. Ele vor fi astfel capabile să stimuleze limfocitele Tc (care recunosc la rândul lor antigenul dar prezentat împreună cu moleculele HLA de clasă I), limfocitele B (care se vor putea diferenţia în plasmocite şi secreta anticorpi), dar şi alte celule aparţinând apărării nespecifice.

S-a demonstrat cã moleculele HLA pot fi implicate în lume animală şi într-o serie de fenomene ne-imunologice (diferenţierea structuralã, atingerea greutăţii corporale optime, producţia de ouã, alegerea partenerului etc), multe din aceste fenomene având o bază hormonalã. Moleculele MHC de clasă I ar putea funcţiona şi ca nişte componente ale unor receptori hormonali sau factori de creştere.

Sistemul HLA a intrat practic în atenţia cercetătorilor odată cu primele experimente de transplant, dar această intervenţie este una pe care sistemul imun nu a avut-o în vedere. Genele şi moleculele HLA au fost concepute, aşa cum menţionam anterior, în scopul prezentării antigenelor şi activării limfocitelor T. Diversitatea acestui sistem a fost creată nu pentru a ridica o barierã în calea transplantării, ci pentru a oferi cât mai multe şanse de supravieţuire în faţa agresiunii patogenilor organismului respectiv. Dacã astãzi alotransplantul a devenit o manevrã terapeuticã uzualã, cu un grad relativ ridicat de succes, este şi pentru cã s-a ajuns la un anumit nivel de înţelegere al sistemului imun. Astfel, suntem perfect conştienţi cã nu putem realiza o potrivire perfectã între un donator şi un primitor, iar potrivirea (*match*) dintre cei doi vizează doar anumite alele şi molecule HLA. În plus, chiar şi în condiţiile în care terapia imunosupresoare a crescut semnificativ supravieţuirea organului transplantat, riscul rejetul acut nu a fost încã eliminat.

3. SISTEMUL HLA ŞI ASOCIEREA CU DIVERSE AFECŢIUNI

Diverse studii statistice au reuşit să demonstreze cã anumite afecţiuni autoimune, boli determinate ca o consecinţă a infecţiilor virale sau bacteriene, afecţiuni ale sistemului complement sau afecţiuni alergice par să fie asociate mai frecvent cu anumite alele MHC. Această asociere dintre alelele HLA şi o anumită boală a condus la noţiunea de “risc relativ”, sintagmă care semnifică probabilitatea ca persoana prezentând o anumită alelă (sau constelaţie

de alele) HLA, să dezvolte afecţiunea respectivă[16]. Un risc relativ de 1 înseamnă că alela HLA vizată este prezentă, la individul afectat, cu aceeaşi frecvenţă ca în populaţia generală. Un risc relativ (substanţial) mai mare decât 1 avertizează însă asupra potenţialei susceptibilităţi a individului de a dezvolta o anumită afecţiune. Astfel, o persoană care posedă alela HLA-B27 prezintă o probabilitate de 90 de ori mai mare să dezvolte spondilită anchilozantă decât o persoană care nu are această alelă (tabelul 16.1).

Un risc relativ înseamnă o vulnerabilitate crescută în faţa bolii. Sistemul HLA nu este însă nici pe departe singurul care intervine în determinismul unei afecţiuni. Cu siguranţă că cel mai elocvent exemplu este dat de situaţiile în care doar unul dintre gemenii monozigoţi dezvoltă boala. Asocierea unei alele HLA particulare cu o anumită boală este cu atât mai dificilă în contextul dezechilibrului de înlănţuire şi trebuie interpretată cu precauţie.

Explicaţiile pentru asocierea dintre HLA şi o serie de boli sunt multiple. În ceea ce priveşte bolile infecţioase şi afecţiunile autoimune, cea mai plauzibilă ipotezã se referă la capacitatea sau incapacitatea unui anumit produs MHC de a prezenta sau nu un antigen particular. Reducerea polimorfismului HLA în cadrul unui grup populaţional antrenează predispoziţia către boli infecţioase. Pe de altă parte, moleculele MHC însele pot servi drept ţinte/receptori pentru agenţi patogeni virali sau bacterieni. De asemenea, un mecanism de evaziune a imunităţii din partea agenţilor patogeni implică mutaţii care conduc la codificarea unor epitopi majori ce mimează moleculele MHC ale organismului infectat. În aceste condiţii polimorfismul MHC va face ca măcar o serie de indivizi ai speciei respective să poată supravieţui agresiunilor şi va permite selecţia în continuare a anumitor alele.

În cazul hemocromatozei ereditare şi hiperplaziei suprarenaliene congenitale este vorba mai curând de o *înlănţuire genetică* între alele patogene şi anumite alele HLA, determinată de situarea acestor gene de boală în regiunea HLA. La aceasta se poate adăuga un dezechilibru de înlănţuire (de exemplu, între hemocromatoză şi HLA-A3).

În alte afecţiuni nu este clar dacă asocierea cu o anumită genă HLA este determinată de variaţii în răspunsul imun sau de un dezechilibru de înlănţuire. De exemplu asocierea dintre narcolepsie şi HLA-DQ6 sau asocierea dintre diabetul zaharat insulino-dependent şi HLA-DQ8 sau HLA-DQ6.

Tabel 16.1 Exemple de asocieri ale alelelor HLA cu o serie de afecţiuni.
Se remarcă faptul că majoritatea sunt autoimunităţi.

Boala	**Alelele HLA asociate**	**Riscul relativ**
Spondilita anchilozantă	B27	90
Sindromul Goodpasture	DR2	16
Enteropatia glutenică	DR3	12
Hemocromatoza ereditară	A3 B14 A3/B14	9,3 2,3 90
Diabetul zaharat insulino-dependent	DR3/DR4 DQ8	20 14
Scleroza multiplă	DR2	5
Miastenia gravis	DR3	10
Narcolepsia	DR2	130
Artrita reactivă (*Yersinia, Salmonella, Gonococcus*)	B27	18
Sindrom Reiter	B27	37
Artrita reumatoidă	DR4	10

[16] Riscul relativ (RR) se calculează după următoarea formulă: RR=ad/bc, unde a = proporţia de pacienţi care prezintă alela respectivă, b = proporţia de pacienţi care nu prezintă alela respectivă, c = frecvenţa alelei în grupul de control, f = frecvenţa absenţei alelei în grupul de control.

Sindromul Sjögren	Dw3	6
Lupusul eritematos diseminat	DR3	5
Tiroidita subacută	B35	14
Psoriazisul vulgar	Cw6	7
Boala Grave	DR3	4
Hiperplazia congenitală suprarenaliană (deficienţa de 21-hidroxilază)	Bw47	80-140
Pemfigusul vulgar	DR4	24
Carcinomul cervical cu celule scuamoase	DQw3	7

D. IMUNODEFICIENŢELE

Eficienţa apărării organismului împotriva agenţilor patogeni şi ai produşilor toxici ai acestora depinde de funcţionarea normală a sistemului imun. De aceea, lipsa sau funcţionarea anormală a componentelor acestui sistem, fie că aparţin imunităţii specifice sau nespecifice, conduce la o serie întreagă de afecţiuni, denumite generic imunodeficienţe. O primă clasificare poate împărţi imunodeficienţele în *primare* (când deficienţa este chiar cauza bolii) şi *secundare* (care apar ca o consecinţă a altor afecţiuni). Imunodeficienţele primare pot fi, la rândul lor, *ereditare* şi *dobândite*. Imunodeficienţele pot fi de asemenea definite în funcţie de componentul afectat: deficienţe ale limfocitelor B, ale limfocitelor T, deficienţe B şi T combinate, ale fagocitelor sau procesului de fagocitoză şi ale sistemului complement. Indiferent în care categorie se încadrează, principala consecinţă este reprezentată de o susceptibilitate crescută faţă de o serie de agenţi patogeni (dintre care se remarcă microorganismele oportuniste) şi apariţia de infecţii a căror severitate poate pune chiar în pericol viaţa pacientului. Alte consecinţe sunt reprezentate de frecvenţa crescută a apariţiei unor afecţiuni maligne, sau de posibilitatea declanşării unor afecţiuni autoimune.

Imunodeficienţele limfocitelor B afectează (cantitativ sau calitativ) producţia de anticorpi şi conduc la infecţii recurente cu bacterii piogene, ca şi la o sensibilitate crescută faţă de anumite virusuri. Originea imunodeficienţelor ereditare se regăseşte fie în cursul maturării limfocitului B, fie în cursul răspunsului limfocitului B faţă de un antigen. Dată fiind dependenţa limfocitelor B de ajutorul limfocitelor T helper, anormalităţi ale acestora din urmă vor conduce, de asemenea, la afectarea secreţiei de anticorpi.

Imunodeficienţele limfocitelor T vor afecta în primul rând imunitatea celulară, dar, aşa cum menţionam, imunitatea umorală va avea de asemenea de suferit. Va apărea astfel o susceptibilitate crescută la infecţiilor cu virusuri, fungi, protozoare şi bacterii intracelulare. Aceste imunodeficienţe pot fi rezultatul unei tulburări de maturare a limfocitelor T ca urmare a unei aplazii/hipoplazii timice, sau ale unor anormalităţi ale activării şi funcţionării limfocitelor în urma activării antigenice.

Afectarea ambelor tipuri de limfocite conduce la SCID (*Severe Combined Immune Defficiency* – Imunodeficienţe Severe Combinate). Acesta este un grup heterogen de imunodeficienţe, în care indivizii sunt practic susceptibili la infecţii cu oricare patogen. Sunt descrise 3 subgrupuri:

- T- B+ în care este afectată fie gena de pe cromosomul X care codifică lanţul γ al receptorilor pentru interleukinele-2, 4, 7, 9 şi 15, fie gena care codifică Jak 3 tirozin-kinaza, o moleculă responsabilă pentru transducerea intracelulară a semnalului recepţionat de aceşti receptori (transmitere recesiv autosomală);

- T- B- în care se manifestã fie o deficienţã în ADA (adenosin dezaminazã)[17], fie deficienţe ale recombinazelor RAG;
- T+ B+ în care limfocitele nu se pot activa în special ca urmare a absenţei moleculelor MHC (sindromul limfocitelor goale).

Principala imunodeficienţã care afecteazã fagocitele este *boala granulomatoasã cronicã*, denumitã astfel ca urmare a formãrii de leziuni inflamatorii cronice. Celulele sunt capabile sã internalizeze patogenul dar nu reuşesc sa îl ucidã intracelular. Afecţiunea poate fi transmisã autosomal recesiv, dar cel mai frecvent este implicatã o genã de pe cromosomul X care codificã o subunitate a citocromului b. La acest nivel are loc asamblarea NADPH oxidazei, responsabilã pentru activarea mecanismelor oxigen dependente de ucidere intracelularã.

Deficienţele sistemului complement (care pot afecta atât cãile de activare cât şi sistemul reglator) sunt caracterizate printr-o susceptibilitate crescutã la infecţiile cu piogeni şi bacterii intracelulare, dar si prin tendinţa de persistenţã a complexelor imune circulante şi, implicit, de apariţie a unor autoimunitãţi sistemice.

Imunodeficienţele pe care le-am menţionat pot fi încadrate totodatã şi în categoria bolilor care apar ca o consecinţã a afectãrii unei singure gene. Aceste afecţiuni sunt numeroase (tabel 16.2) şi suntem conştienţi cã nu avem încã o imagine completã asupra acestora. Sistemul imun reprezintã însã un angrenaj extrem de complex, astfel încât un anumit defect genetic poate conduce la efecte surprinzãtoare, cu grade foarte diferite de severitate. Cu atât mai mult, tratarea unor astfel de boli va depinde tot mai mult de izolarea şi caracterizarea genelor care stau la baza unor astfel de afecţiuni.

Tabelul 16.2 Exemple de imunodeficienţe monogenice
(dupã Nussbaum, McInnes, Willard, 2001)

Boala	***Gena***	***Localizare cromosomicã***	***Defectul genic/patogenia bolii***	***Numãrul L_T***	***Numãrul L_B***	***Nivelul Ig***	***OMIM***
Defecte combinate ale limfocitelor T şi B							
Imunodeficienţa combinatã severã (SCID) legatã de X	IL2RG	Xq13.1	Defectul lanţului γ al receptorului pentru IL-2	Redus	Normal sau crescut	Redus	300400
SCID autosomal recesivã tipul T-negativ/B-pozitiv	JAK3	19p13.1	Defecte ale semnalizãrii intracelulare pe calea JAK	Redus	Normal sau crescut	Redus	600802
Deficienţa adenozin dezaminazei	ADA	20q13.11	Tulburare selectivã la nivelul limfocitelor a metabolismului purinic	Scade progresiv	Scade progresiv	Redus	102700
Deficienţa nucleozid fosforilazei	NP	14q13.1	Tulburarea metabolismului purinic la nivelul limfocitelor	Scade progresiv	Normal	Normal sau redus	164050
Sindromul limfocitelor goale tip II	MHC2TA RFX5	16p13 1q21.1-q21.3	Mutaţii ale factorilor de transcripţie ce reglează expresia genelor MHCII	CD4 reduse	Normal	Normal sau redus	209920
Imunodeficienţa datã de defectul selectiv al limfocitelor T	ZAP70	2q12	Blocarea maturării limfocitelor T	CD8 reduse	Normal	Normal	176947
Imunodeficienţa combinatã severã fãrã limfocite B	RAG1 RAG2	11p13	Blocarea dezvoltării limfocitelor; absenţa rearanjamentelor	Redus	Absent	Absent	601457

[17] ADA este o enzimã folositã pentru degradarea purinelor. În absenţa ei, celulele acumuleazã cantitãţi excesive de adenozinã şi deoxiadenozinã, toxice în mod particular pentru limfocite. O altã enzimã, PNP (purin nucleotid fosforilaza) degradeazã guanozina la inozinã. Absenţa sa conduce la acumularea excesivã de metaboliţi ai guanozinei (GMP, GDP şi GTP) şi ai deoxiguanozinei (dGMP, dGDP şi dGTP), care, ca şi metabolitii adenozinei, sunt toxici pentru limfocite.

Boala	*Gena*	*Localizare cromosomicã*	*Defectul genic/patogenia bolii*	*Numãrul L_T*	*Numãrul L_B*	*Nivelul Ig*	*OMIM*
			receptorilor L_T şi L_B				
Sindromul Omenn	RAG1 RAG2	11p13	Rearanjamente deficitare ale receptorilor L_T si L_B	Redus	Redus	Redus	603554
Imunodeficienţa cu hiper IgM, tip 1	TNFSF5	Xq25-q26	Defecte ale ligandului CD40 exprimat pe suprafaţa L_T; blocarea comutãrii isotipului L_B	Normal	Normal	IgM crescut; IgA, IgG redus	308230
Sindromul DiGeorge	multiple	22q11.2	Defecte ale dezvoltãrii timusului; anomalii cardiace, faciale, paratiroidiene	Normal sau redus	Normal	Normal sau redus	188400
Deficite ale sintezei anticorpilor							
Agamaglobulinemia legatã de X (sindromul Bruton)	BTK	Xq21.3-q22	Defecte ale tirozin kinazei Bruton specifice L_B	Normal	Foarte redus	Redus sau absent	300300
Agamaglobulinemia autosomal recesivã	IGHM	14q32.3	Defecte ale expresiei lanţului μ pe suprafaţa celulelor B	Normal	Absent	Absent	147020
Boli ale fagocitelor							
Boala granulomatoasã cronicã	CYBB CYBA NCF1 NCF2	Xp21.1 16q24.1 7q11.23 1q25	Defecte ale enzimelor sistemului citocrom oxidazei care conduc la anomalii ale fagocitozei	Normal	Normal	Normal	306400 233690 233700 233710
Deficienţa adeziunii leucocitelor	CD18	21q22.3	Defecte ale CD18 sau alte molecule de pe suprafaţa leucocitelor necesare pentru motilitate, aderenţã şi endocitozã	Normal	Normal	Normal	116920
Sindromul Chediak-Higashi	CHS1	1q42-q44	Defecte ale asamblãrii lizozomilor ce conduc la granule citoplasmatice gigantice	Normal	Normal	Normal	214500
Boli ale sistemului complement							
Deficienţe ale unor componente individuale	multiple	multiple	Deficienţele C1, C2, C4, C3 sunt asociate cu boli autoimune şi infecţii piogene; deficienţele C3, C5-9 şi properdinei asociazã infecţii cu *Neisseria*	Normal	Normal	Normal	multiple
Alte sindroame distincte cu defecte imune							
Sindromul Wiskott-Aldrich	WAS	Xp11.23	Defecte ale citoscheletului ce determinã eczemã, trombocitopenie, infecţii recurente	Normal sau redus	Normal	Uneori IgM redus	301000
Ataxia telangiectazia	ATM	11q22-q23	Defecte ale reparãrii ADN; ataxie, cancere, neurodegenerare progresivã, radiosensibilitate	Normal	Normal	Normal	208900
Sindromul Bloom	BLM	15q26.1	Defecte ale reparãrii ADN; neurodegenerare, cancere, radiosensibilitate	Normal	Normal	Normal	210900
Sindromul limfoproliferativ	TNFRSF6	10q24.1	Tulburãri ale apoptozei L_T şi L_B mediatã de	Creşterea L_T CD4-/	Crescut	Crescut	601859

Boala	*Gena*	*Localizare cromosomicã*	*Defectul genic/patogenia bolii*	*Numãrul L_T*	*Numãrul L_B*	*Nivelul Ig*	*OMIM*
autoimun tip IA			FAS; limfoadenopatie, autoimunitate	CD8-			

BIBLIOGRAFIE CAPITOL 16

INTERNET

1. Asociaţia naţională pentru boli rare (SUA)- NORD : http://www.NORD~rdb.com/~orphan
2. Kuby's Immunology – Goldsby R., Kindt TJ, Osborne B., W. H. Freeman, New York, 2000; www.whfreeman.com/immunology
3. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : http://geneclinics.org
4. Genecards – bază de date genele umane şi bolile genetice : : http://www.bighost.area.ba.cnr.it/GeneCards –sau http://www.bioinformatics.weizman.ac.il/cards
5. Genetest – bază de date despre teste genetice : http://www.genetest/org
6. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
7. Web site-uri de patologie umană:
   - http://www.emedicine.com,
   - http://www.umm.edu/ency/,
   - http://healthcenters.healthanswers.com/library/MedEnc,

Bibliografie specifică selectivă

1. Abbas AB, Lichtman AH, Pober JS, WB – *Cellular and Molecular Immunology* – Saunders, Philadelphia,2000
2. Benjamini E, Coico R, Sunshine G – *Immunology, a short course* – Wiley-Liss, New York, 2000
3. Fugmann SD, Lee, AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG – *The RAG proteins and V(D)J Recombination: Complexes, Ends and Transposition* – Annu. Rev. Immunol. 2000, 18: 495-527
4. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M – *Molecular Mechanism of Class Switch and Recombination: Linkage with somatic Hypermutation* – Annu. Rev. Immunol. 2002, 20: 165-196
5. Janeway CA jr., Travers P, Walport M., J. Capra JD – *Immunobiology* – Current Biology Ltd., Elsevier, New York, 1999
6. Goldsby R, Kindt TJ, Osbirne B - *Kuby's Immunology* – Freemanand Co, New York, 2000.
7. Nemazee D – *Receptor Selection in B and T Lymphocytes* – Annu. Rev. Immunol. 2000, 18: 19-51
8. Paul W.E – *Fundamental Immunology* – Raven Press, New York, 1993
9. Puck JM – *Primary immunodeficiency diseases* – JAMA, 1997ş278:1835-1841
10. Roitt I. – *Essential Immunology* – Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1998

CAPITOLUL 17

GENETICA BOLII CANCEROASE

Cancerul este un termen generic pentru o gamă extrem de largă de boli caracterizate prin alterarea proceselor de creştere şi proliferare celulară.

In prezent cancerul este a două cauză de deces după bolile cardiovasculare (circa 25%) dar, o dată cu creşterea duratei medii de viaţă, se estimează că peste jumatate din populaţie ar putea fi diagnosticată cu o formă de cancer într-un anumit moment al vieţii.

Proliferarea celulară necontrolată are ca rezultat formarea unei mase celulare numite **tumoră** sau *neoplasm* (gr. neo = nou, plasein = a forma). Procesul de formare a unei tumori este denumit *tumorigeneză*. Neoplasmele *maligne* invadează ţesuturile învecinate şi adesea *metastazează* (diseminează) colonizând teritorii aflate la distanţă, trăsături care le disting pe acestea de tumorile *benigne*. Tumorile sunt clasificate în funcţie de ţesuturile din care se formează, principalele tipuri fiind: *carcinoamele* (tumori derivate din celulele epiteliale) - categoria cea mai frecventă, *sarcoamele* (derivate din ţesuturile conjunctive), *limfoamele* (ţesuturile limfatice) şi *leucemiile* (ce afectează organele hematopoietice).

Celulele care formează o tumoră au originea într-*o singură celulă precursoare*, care se multiplică activ şi formează o **clonă**. Celulele din clona neoplazică în formare *acumulează o serie de modificări genetice şi epigenetice* care conduc la schimbări în activitatea unor gene şi, datorită acestora, la modificări fenotipice. Celulele sunt supuse selecţiei şi, în final, o populaţie a celulelor clonale acumulează suficiente modificări fenotipice pentru ca acel teritoriu să devină un cancer. Aceste trăsături sunt:

- autosuficienţa factorilor de creştere,
- insensibilitatea la semnalele care blochează creşterea,
- capacitatea de proliferare necontrolată,
- sustragerea de sub controlul mecanismelor apoptotice,
- capacitatea de invazie,
- metastazare şi angiogeneza susţinută.

Cauzele care conduc la apariţia cancerelor sunt numeroase şi variate şi includ *factorii de mediu, predispoziţia genetică şi vârsta*. Aceşti factori determină sau contribuie la transformarea celulelor normale în celule canceroase prin perturbarea unui spectru larg de căi fiziologice. Această complexitate a mecanismelor fiziopatologice este principala piedică în dezvoltarea unor mijloace terapeutice specifice şi eficiente.

Factorii de mediu sunt consideraţi a fi principala cauză în dezvoltarea cancerelor (aproximativ 75% din cazuri). Indiferent de etiologie însă, toate cancerele apar ca urmare a unor evenimente genetice şi epigenetice. Majoritatea acestor evenimente se produc în cursul vieţii individului, la nivelul celulelor somatice. În absenţa reparării lor, aceste *mutaţii somatice* sau *dobândite* se vor transmite la celulele fiice, conducând la formarea unei clone. Deoarece apar la nivelul celulelor somatice, asemenea mutaţii nu pot fi însă transmise în succesiunea generaţiilor de organisme; ele nu sunt ereditare.

Uneori, anumite mutaţii care predispun la apariţia cancerului apar la nivelul celulelor germinale. Asemenea *mutaţii germinale* se transmit de la o generaţie la alta şi au ca rezultat agregarea familială a unor cancere specifice.

Indiferent dacă un cancer apare spontan la un singur individ sau se produce la mai multe persoane dintr-o familie, ca un caracter ereditar – *cancerul este considerat o boală genetică* deoarece iniţierea şi dezvoltarea unei tumori implică producerea în cascadă a unor mutaţii multiple, în diferite gene care controlează proliferarea celulară, repararea ADN, ciclul mitotic şi moartea celulară.

A. CLASE DE GENE IMPLICATE ÎN DEZVOLTAREA CANCERULUI

Cancerul se dezvoltă ca urmare a mutaţiilor la nivelul genelor care controlează proliferarea şi moartea celulară. Aceste gene pot fi separate în două categorii majore: *oncogenele* şi *genele supresoare de tumori*.

- **Oncogenele** reprezintă variantele mutante (activate) ale unei clase de gene normale numite **protooncogene**. Activarea acestor gene este rezultatul unor mutaţii *cu câstig de funcţie*. Oncogenele au efect *dominant* la nivel celular; ca atare, o singură alelă mutantă (activată) este suficientă pentru modificarea fenotipului celular.
- **Genele supresoare de tumori** sunt gene care blochează dezvoltarea neoplaziilor maligne prin reglarea creşterii şi proliferarii celulare. Mutaţii *cu pierderea funcţiei* acestor gene conduc la proliferare şi creştere celulară necontrolate şi la apoptoza ineficientă. Genele supresoare de tumori se manifestă ca gene *recesive* la nivel celular, pentru convertirea fenotipului fiind necesară pierderea sau mutaţia ambelor alele (inactivarea alelică).

1. ONCOGENELE

Primele date despre existenţa oncogenelor au fost aduse la sfârşitul anilor '60 prin studiul unor *virusuri* capabile să inducă dezvolarea unor tumori la diverse specii animale. Ulterior s-a demonstrat că o singură genă din structura acestor virusuri poate fi responsabilă de această transformare. Primul exemplu a fost gena *src* a virusului sarcomului avian Rous[1]. Asemenea gene au fost denumite **oncogene virale** (*v-onc*). Gene înrudite ca secvenţă cu cele ale retrovirusurilor oncogene au fost însă identificate şi în ADN-ul celulelor umane normale. Aceste gene îndeplinesc funcţii în controlul creşterii şi diferenţierii celulare, iar *activarea* lor necorespunzatoare, ca moment şi ca loc, poate conduce la apariţia cancerului. Genele celulare normale au fost denumite **protooncogene**, iar variantele lor activate – **oncogene celulare** (*c-onc*).

Au fost identificate şi virusuri oncogenice umane. Printre acestea se numară atât virusuri ARN (precum virusul HTLV1 implicat în etiologia leucemiilor adulte cu celule T sau virusul hepatitic tip C care determină cancere hepatocelulare), cât şi virusuri cu genom ADN (cum sunt, de exemplu, virusul *Papilloma* – HPV – implicat în producerea cancerelor tractului genital, virusul hepatitic tip B – hepatocarcinoame, virusul Epstein-Barr – limfomul Burkitt, virusul HV40 – mezotelioame sau virusul herpetic tip 8 – sarcomul Kaposi).

La sfârşitul anilor '70 a fost dezvoltată o modalitate complet diferită de identificare a oncogenelor, bazată pe metode de *transformare celulară*. Asemenea experimente au permis introducerea prin **transfecţie**[2] a unor fragmente de ADN provenite din celule canceroase umane în culturi de celule non-neoplazice (linia de fibroblaşti NIH-3T3). Prima genă care a indus transformarea tumorală prin această tehnică a fost o variantă mutantă a genei HRAS, o protooncogenă deja cunoscută din studiile retrovirale.

---

[1]Denumirea oncogenelor identificate prin studiul virusurilor oncogene a fost bazată pe numele acestora. De exemplu, SRC este o oncogenă a virusului sarcomului Rous (Rous sarcoma virus), SIS o oncogenă a virusului sarcomului simian (Simian sarcoma virus), RAS este virusul sarcomului şobolanilor (rat sarcoma virus) şi aşa mai departe.

[2]Transfecţia reprezintă introducerea unei gene într-o celulă, permiţând celulei transfectate să sintetizeze proteina corespunzătoare.

În sfârşit, o altă sursă de identificare a oncogenelor a fost analiza punctelor de ruptură din *translocaţiile cromozomice* asociate constant cu anumite forme de cancer. Asemenea exemple sunt gena MYC în limfomul Burkitt[3] ori gena ABL în leucemia mieloidă cronică.

În prezent sunt cunoscute peste 100 oncogene (vezi tabelul 17.1). În funcţie de nivelul celular unde acţionează proteinele codificate de acestea, oncogenele pot fi clasificate în mai multe categorii (figura 17.1):

(1) oncogene care codifică *factori de creştere* (de exemplu PDGFB);
(2) oncogene care codifică *receptori ai factorilor de creştere* (de exemplu EGFR, RET);
(3) oncogene care codifică *componente ale căilor de semnalizare intracelulară* (de exemplu familia RAS, gena ABL);
(4) oncogene care codifică *proteine nucleare*, în special factori de transcripţie (de exemplu MYC);
(5) oncogene care codifică proteine implicate în *controlul ciclului celular* (de exemplu MDM2).

Tabelul 17.1. Exemple de oncogene activate în cancerele umane

Oncogena	Localizarea cromosomică	Funcţia proteinei codificate
ABL	9q34.1	tirozin kinaza citoplasmatică
CCND1	11q13	ciclina D1 implicată în controlul ciclului celular
EGFR (ERBB1)	7p12.3-p12.1	receptorul pentru factorul de creştere epidermal
ERBB2 (HER2/neu)	17q21.1	receptor membranar tirozin kinazic înrudit cu EGFR
MDM2	12q14.3-q15	reglator al activităţii proteinei p53
MET	7q31	receptor transmembranar pentru factorul de creştere hepatocitar (HGF)
MYC	8q24.1	factor de transcripţie
MYCN	2p24.1	factor de transcripţie
MYCL1	1p34.3	factor de transcripţie
PDGFB	22q13.1	subunitatea ß a factorului de creştere derivat din plachete
HRAS	11p15.5	proteina G citoplasmatică
KRAS2	12p12.1	proteina G citoplasmatică
NRAS	1p13.2	proteina G citoplasmatică
RET	10q11.2	receptor transmembranar tirozin kinazic pentru factorul neurotrofic derivat din celulele gliale (GDNF) şi pentru neurturina

Fiind gene *dominante*, majoritatea mutaţiilor responsabile de *activarea* oncogenelor apar la nivelul celulelor somatice. Mutaţiile germinale sunt considerate a fi, foarte probabil, incompatibile cu dezvoltarea embrionară. Sunt cunoscute totuşi două excepţii în care mutaţiile oncogenelor pot fi transmise de la o generaţie la alta, determinând forme ereditare de cancer:

- neoplaziile endocrine multiple tip 2 determinate de mutaţiile oncogenei RET (vezi subcapitolul 17. D 1.1);
- cancerul renal papilar ereditar produs prin mutaţia oncogenei MET.

Activarea oncogenelor în celulele somatice se poate realiza prin mai multe mecanisme:

1) Activarea oncogenelor prin mutaţii punctiforme.

Acest mecanism este întâlnit în cazul unor oncogene care codifică receptori transmembranari sau proteine citoplasmatice (exemple: gena RET, familia genelor RAS etc.). De pildă, genele RAS codifică proteine G (care leagă guanozin-trifosfat – GTP) implicate în căile de transducţie ale semnalelor. Mutaţiile punctiforme ale acestor gene conduc la sinteza unor proteine RAS anormale, capabile să semnalizeze continuu, chiar în absenţa GTP. Rezultatul este

[3]Limfomul Burkitt este o forma agresivă de limfom cu origine în celulele tip B.

stimularea creşterii celulare şi transformarea tumorală. Mutaţiile RAS sunt observate în aproximativ 15% din toate cancerele (al doilea eveniment mutaţional ca frecvenţă după mutaţia genei TP53), dar mult mai adesea în unele forme de cancer, cum sunt cele de colon, sân, plămâni şi vezica urinară. În plus, genele RAS au fost documentate experimental a fi ţinta mutaţională a diverşi carcinogeni.

2) Activarea oncogenelor prin translocaţii cromozomice.

Uneori protooncogenele pot fi activate prin mutaţii cromozomice, cel mai adesea translocaţii. Au fost descrise peste 40 asemenea translocaţii cu potential activator al unor oncogene, în special în leucemii şi limfoame, dar şi în unele sarcoame (vezi tabelul 17.2).

Există două mecanisme prin care translocaţiile cromozomice pot conduce la activarea oncogenelor. În unele cazuri punctele de ruptură sunt localizate la nivelul intronilor a două gene, rezultatul rearanjării cromozomice fiind producerea unei proteine *himeric*e, cu proprietăţi noi (mutaţie cu câştig de funcţie). Cel mai cunoscut exemplu este translocaţia între cromosomii 9 şi 22 întâlnită în **leucemia mieloidă cronică** (vezi caseta 17.1). Alterori translocaţia activează o oncogenă prin plasarea acesteia în apropierea unui promotor puternic din structura altei gene. Un asemenea exemplu îl constituie activarea oncogenei MYC în limfomul Burkitt prin plasarea acesteia din poziţia sa normală (8q24) în proximitatea promotorului genei pentru lanţul greu al imunoglobulinelor (14q32), foarte activ în celulele B care sintetizează Ig.

3) Activarea oncogenelor prin amplificare genică.

Amplificarea genică este un fenomen care are ca rezultat producerea mai multor copii ale unor oncogene normale structural. Fenomenul este responsabil de activarea unor oncogene precum cele din clasa MYC şi ERB (vezi subcapitolul 17.B.).

4) Activarea oncogenelor prin inserţie virală.

Retrovirusurile oncogene, ca de exemplu HTLV1, îndeplinesc rolul unor vectori, transportând oncogene activate de la un organism la altul. Virusurile ADN acţionează însă prin inserţia în genomul gazdă a unor oncogene fără corespondent uman (ca, de pildă, gena pentru antigenul T al virusului SV40 – implicat în etiologia mezotelioamelor, ori antigenele E6 şi E7 ale papilomavirusului tip 16 – implicat în producerea cancerelor de col uterin).

Caseta 17. 1.

Leucemia mieloidă cronică (LMC)

LMC este o boală caracterizată prin expansiunea clonală a celulelor stem hematopoietice transformate malign, ceea ce are drept rezultat o creştere a numarului celulelor mieloide, eritroide şi al plachetelor circulante. Transformarea celulelor circulante are loc ca rezultat al expresiei oncogenei himerice BCR-ABL.

Aproximativ 95% din pacienţii cu LMC au un cromozom Philadelphia, produs prin translocaţia t(9;22), iar restul au translocaţii complexe sau variante ale translocaţiei principale. Protooncogena ABL (Abelson) care codifică o tirozin kinază citoplasmatică este localizată pe cromozomul 9q34, iar gena BCR (breakpoint cluster region), ce codifică o fosfoproteină, este localizată pe cromozomul 22q11. În cursul formarii cromosomului Philadelphia gena ABL este ruptă la nivelul intronului 1, iar gena BCR cel mai adesea la nivelul intronului 11. În urma translocaţiei, la nivelul cromosomului 22 se formează gena himerică BCR-ABL alcătuită din exonii 1-11 ai genei BCR şi 2-11 ai genei ABL (vezi figura 17.1).

Figura 17.2. Translocaţia t(9;22) care conduce la formarea cromosomului Philadelphia în LMC

Până în prezent nu se cunosc pe deplin funcţiile proteinelor BCR şi ABL. Proteina ABL se găseşte în citoplasmă, nucleu şi la nivelul membranei celulare şi intervine în multiple procese: controlul ciclului celular, semnalizarea integrinică şi dezvoltarea neurală. Proteina BCR este implicată în reglarea activităţii proteinelor din familia RAS şi a GTP-azelor RAC şi RHO. Spre deosebire de proteina ABL normală, proteina himerică are activitate tirozin kinazică constitutivă şi este localizată în principal în citoplasmă, unde se leagă intens de microfilamentele de actină. BCR-ABL

fosforilează câteva substraturi citoplasmatice şi activează, probabil, o serie de cascade de semnalizare care controlează creşterea şi diferenţierea, precum şi adeziunea celulelor hematopoietice. Proliferarea necontrolată a celulelor stem hematopoietice conduce la eliberarea în circulaţie a unor celule imature, generând LMC.

In cursul progresiei LMC pot apare modificări cromosomice noi, precum trisomia 8 sau 19, i(17q) ori un al doilea cromozom Philadelphia. Apariţia acestor modificări are ca rezultat debutul crizei blastice.

Din punct de vedere clinic LMC se caracterizează prin evoluţie trifazică. Stadiul iniţial (sau cronic) este caracterizat prin debut insidios cu manifestări precum fatigabilitatea, pierderea ponderală, splenomegalia minimă sau moderată. În timp, LMC evoluează spre o fază accelerată şi apoi spre criza blastică caracterizată prin leucocitoză progresivă, anemie, trombocitoză sau trombocitopenie, febră, accentuarea splenomegaliei şi leziuni osoase, cu evoluţie fatală rapidă.

Metodele de tratament utilizate constau în transplantul medular sau administrarea de alpha interferon pentru cei fără donori compatibili. Administrarea altor citostatice are efecte numai pe scurte perioade de timp. Identificarea proteinei de fuziune BCR-ABL a condus la sinteza unui inhibitor specific (Imatinib mesylate – Gleevec) capabil să inducă moartea prin apoptoză exclusiv a celulelor care exprimă proteina anormală. Imatinib mesylate-ul este un medicament extrem de eficient şi a devenit rapid agentul terapeutic de elecţie pentru cazurile noi de LMC pentru care nu este indicat transplantul medular alogenic.

2. GENELE SUPRESOARE DE TUMORI

Experimentele de fuziune celulară au evidenţiat faptul că fenotipul transformant al unei celule tumorale poate fi adesea corectat prin fuziunea celulei maligne cu una normală. Aceata arată că tumorigeneza implică nu numai activarea dominantă a unor oncogene, dar şi mutaţii *cu pierderea funcţiei* ale altor gene. Aceste gene au fost denumite **gene supresoare de tumori**[4] (*"tumor-suppressor genes"*). Deoarece celulele rezultate în urma acestor fuziuni sunt cu certitudine heterozigote, genele supresoare de tumori au efect *recesiv* la nivel celular.

Conceptele şi metodele de cercetare ale genelor supresoare de tumori au fost definite prin studiul retinoblastomului, o formă rară de tumoră oculară (vezi subcapitolul 17.D.1.2). Circa 60% din cazurile de **retinoblastom** apar ca tumori sporadice şi unilaterale, iar 40% în cadrul unei boli ereditare cu transmitere autosomal dominantă, neoplazia fiind adeseori bilaterală, multicentrică şi cu debut mai timouriu. Pentru a explica diferenţele între cele două forme de boală, Knudson a propus în 1971 *ipoteza celor două evenimente* ("two hits") necesare pentru transformarea unei celule normale într-o celulă tumorală. In cazurile de retinoblastom ereditar prima mutaţie este moştenită şi prezentă la naştere în toate celulele organismului. A două mutaţie poate apărea la nivelul uneia sau mai multor celule retiniene, ceea ce explică frecvenţa relativ crescută a retinoblatoamelor bilaterale în forma familială de boală. De asemenea, moştenirea primei mutaţii explică debutul mai timpuriu al bolii.

Deşi genele supresoare de tumori au efecte recesiv la nivel celular, posibilitatea apariţiei unei mutaţii care să inactiveze a doua alelă în cel puţin o celulă a organismului este crescută şi, ca urmare, retinoblastomul ereditar (ca şi alte boli genetice produse de moştenirea unor asemenea mutaţii ale genelor supresoare de tumori) au un model de *transmitere dominant*. Exista însă şi forme ereditare de cancere determinate prin transmiterea unor mutaţii germinale dar în care modul de transmitere a bolii este unul *recesiv* (vezi tabelul 17.4).

Cavenee şi colaboratorii săi (1983) au demonstrat validitatea ipotezei lui Knudson şi au evidenţiat o serie de mecanisme răspunzătoare de inactivarea celei de-a doua alele a unei gene supresoare de tumori la nivel somatic. Autorii au comparat rezultatele obtinute în urma tipării

[4] Probabil, mai corectă ar fi denumirea "gene supresoare a creşterii tumorale"; oricum, termenul de "antioncogene", folosit iniţial, este impropiu

unor markeri polimorfici de pe cromosomul 13q (identificat a fi purtătorul genei RB – responsabilă de producerea retinoblastomului ereditar) al celulelor sanguine şi al celulelor tumorale. Ei au observat unele cazuri în care probele din sânge prezentau heterozigozitate pentru asemenea markeri, în timp ce celulele tumorale erau aparent homozigote. Concluzia a fost aceea că fenomenul se datorează unuia dintre evenimentele Knudson: pierderea unei copii funcţionale a unei gene supresoare de tumori. Fenomenul a fost denumit *pierderea heterozigozităţii* (*"loss of heterozygosity" - LOH*).

Studiile citogenetice au permis identificarea mai multor mecanisme de inactivare a celei de-a două copii a unei gene supresoare de tumori în cancerele ereditare (figura 17.3):

- deleţii;
- recombinări somatice – prima dovadă a existenţei acestui fenomen la nivelul celulelor somatice;
- pierderea unui cromozom;
- pierderea unui cromozom asociată cu duplicaţia cromozomului restant;

Pierderea heterozigozităţii este mecanismul cel mai frecvent de inactivare a celei de a doua alele în cancerele ereditare produse prin moştenirea unei gene supresoare de tumori mutante. Când pierderea heterozigozităţii nu este observată, cel de-al doilea eveniment mutaţional este de regulă o *mutaţie punctiformă* sau inactivarea transcripţională a celei de-a doua alele printr-un *eveniment epigenetic* (vezi subcapitolul C.2).

Identificarea genelor supresoare de tumori a fost realizată prin două categorii de studii:

- clonarea poziţională a genelor implicate în producerea unor forme rare de cancere ereditare (vezi subcapitolul 17.C.);
- analiza fragmentelor cromozomice care suferă frecvent deleţii în cancerele sporadice (prin studii de pierdere a heterozigozităţii ori hibridizare genomică comparativă).

Genele supresoare de tumori codifică proteine cu funcţii extrem de diverse: receptori membranari (precum PTCH); proteine citoplasmatice (de exemplu: APC, NF1); proteine nucleare (TP53, RB1, VHL, WT1, ATM, BRCA1 etc.).

Genele supresoare de tumori au fost clasificate de către Vogelstein şi Kinzler în 1996 în două categorii majore: gene *gatekeeper* (portar) şi gene *caretaker* (ingrijitor)[5].

- **Genele gatekeeper** sunt gene care codifică proteine implicate direct în *controlul creşterii celulare* (de exemplu inhibând mitoza sau promovând apoptoza). Funcţia acestor gene este critică pentru supresia tumorală. Exemple de gene gatekeeper sunt APC, VHL, TP53, NF1 sau PTEN. Mutaţiile germinale ale tuturor acestor gene determină producerea unor boli genetice cu risc crescut de dezvoltare a cancerului care au o transmitere dominantă (vezi sindromul Li-Fraumeni (vezi subcapitolul D 1.3);
- **Genele caretaker** sunt gene care codifică proteine implicate în *menţinerea stabilităţii genomului*. Alterările acestor gene au drept consecinţă creşterea frecvenţei mutaţiilor la scara întregului genom, inclusiv a protooncogenelor şi a genelor supresoare de tumori, şi determină instabilitate cromosomică.

Toate căile de *reparare ale leziunilor ADN* (vezi capitolul 6) pot fi implicate în producerea cancerelor, dar consecinţele sunt diverse. Astfel, alterările componenetelor implicate în repararea leziunilor ADN prin excizia nucleotidelor (*nucleotide excision repair* - NER) sunt întâlnite în special în cancerele cutanate deoarece această cale este răspunzătoare de repararea leziunilor induse de radiaţiile UV. Mutaţiile genelor care codifică proteinele implicate în calea de

[5]Iniţial genele *caretaker* au fost denumite gene ale controlului integrităţii genomului şi au fost considerate o categorie separată faţă de genele supresoare de tumori. Trăsăturile lor comune (precum caracterul recesiv al mutaţiilor) şi lipsa unei departajări clare între funcţiile lor au condus la reunirea acestora într-o singură clasă, cea a genelor supresoare de tumori.

reparare a erorilor de împerechere (*mismatch repair* - MMR) determină **instabilitatea microsateliţilor**, fenotip întâlnit în cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (HNPCC – vezi subcapitolul 17.D.1.4). Alterările componenteleor implicate în repararea rupturilor ADN au drept consecinţă creşterea frecvenţei anomaliilor cromozomice structurale, caracteristică în special pentru neoplaziile din sfera hematologică, dar şi pentru unele cancere solide. In sfârşit, alterările genei O6 MGMT care protejează împotriva mutaţiilor A – G preced adeseori unele mutaţii punctiforme de acest tip întâlnite la nivelul genelor RAS în cancerele colorectale sau cu alte localizări.

Genele a căror dereglare poate conduce la **instabilitate cromozomică** controlează procese precum condensarea cromozomică, activitatea centromerilor (CDK2, STK15, PLK1), kinetocorilor (APC), ori a punctelor de control care previn separarea prematură a cromatidelor până ce cromosomii sunt corect aliniaţi la nivelul fusului de diviziune (securina, separina, MAD2L1, BUB1 – vezi subcapitolul 17.B).

Intre genele *gatekeeper* şi genele *caretaker* nu există o delimitare precisă. Astfel, genele BRCA1 şi BRCA2 sunt gene *gatekeeper* prin activitatea lor de control a transcripţiei şi gene *caretaker* prin intervenţia lor în calea de reparare a rupturilor ADN bicatenare. De asemeni, gena APC pare a fi implicată şi în controlul stabilităţii genomice.

Pe lângă implicarea lor în producerea unor cancere ereditare, genele supresoare de tumori sunt inactivate adesea şi în cazul cancerelor sporadice. Inactivarea genei TP53[6] este, de exemplu, cel mai frecvent eveniment mutaţional întâlnit în cancerele sporadice (circa 50% din acestea, dar cu frecvenţe mai mari în anumite localizări: cancerele mamare, colorectale, vezicale, pulmonare, cervicale etc.).

Alte gene supresoare de tumori care sunt frecvent inactivate în cancerele sporadice sunt APC (in aproximativ 70% dintre cancerele colorectale), NF1 (în cancerele cu origine în celulele nervoase), genele MMR în circa 15% dintre cancerele colorectale, în timp ce mutaţiile BRCA1 şi BRCA2 sunt întâlnite relativ rar în cancerele de sân şi ovar sporadice.

B. ANOMALII CITOGENETICE IN CANCER

Anomaliile citogenetice sunt consecinţa instabilităţii genomice - caracteristică tuturor cancerelor şi responsabilă de creşterea numărului mutaţiilor care conduc la dezvoltarea neoplaziilor. Există trei categorii majore de anomalii cromozomice care pot fi întâlnite în cancer: anomalii numerice, anomalii structurale şi amplificări genice.

1. ANOMALII CROMOZOMICE NUMERICE

Anomaliile cromozomice numerice implică pierderea sau câştigul unor cromozomi în întregime – *aneuploidie*[7]. Numărul cromozomilor poate fi redus – *hipoploidie*, crescut – *hiperploidie* sau aparent normal – *pseudodiploidie*. Asemenea modificări sunt întâlnite în majoritatea tipurilor tumorale. In general nu există anomalii numerice specifice pentru un anumit tip tumoral, deşi unele variante pot fi întâlnite mai frecvent în unele forme de cancer. Asemenea exemple sunt pierderea cromozomului 10 în glioblastoame (reflectând adesea inactivarea genei supresoare de tumori PTEN), ori adiţia unui cromozom 7 în carcinoamele renale papilare (reflectând duplicaţia oncogenei MET).

---

[6] Rolul central al proteinei TP53 în supresia tumorală a condus la desemnarea acesteia ca "molecula anului" de catre revista Science în 1993 (vezi şi caseta 17.5).

[7] Aneuploidia este definită ca fiind orice număr al cromosomilor care nu este un multiplu exact al unui set haploid de cromosomi.

Existenţa anomaliilor cromozomice în celulele canceroase a fost evidenţiată pentru prima dată de Boveri în 1914 care a postulat teoria aneuploidiei ca baza a dezvoltării cancerelor. Lipsa unor anomalii cromozomice specifice în anumite tipuri de cancere şi evidenţierea mutaţiilor genice a condus la abandonarea în mare parte a acestei teorii. Oricum, unele cercetări recente încearcă să readucă în actualitate această ipoteza. Câteva dintre argumentele aduse în favoarea acestei teorii sunt:

- existenţa unor carcinogeni capabili să inducă aneuploidie fără a produce mutaţii genice (prin alterarea fizică sau chimică a elementelor componente ale fusului de diviziune);
- incapacitatea cercetătorilor de a demonstra clar existenţa unor mutaţii capabile să conducă la transformarea canceroasă a celulelor normale;
- existenţa obligatorie a aneuploidiei în toate liniile celulare imortalizate pe care au fost studiate oncogenele sau genele supresoare de tumori.

Conform acestei teorii, dezvoltarea cancerului se realizează în două stadii:

- stadiul iniţial în care aneuploidia este generată prin alterarea fizică sau chimică a elementelor aparatului mitotic ori prin mutaţia unor gene care controlează activitatea acestor elemente;
- stadiul ulterior în care aneuploidia se propagă autocatalitic datorită dezechilibrului indus între proteinele fusului
de diviziune, proteinele centromerelor şi numărul cromosomilor.

Aneuploidia poate explica mai bine decât mutaţiile unor gene izolate modificările fenotipice dramatice ale celulelor canceroase (deoarece sunt implicate sute sau mii de gene) şi poate explica de asemeni, mai bine, latenţa acţiunii unor carcinogeni ori dobândirea rapidă a rezistenţei multiple a celulelor tumorale la agenţii citostatici.

Una dintre direcţiile majore de cercetare în cancer este identificarea genelor care controlează aparatul mitotic, ţinte în generarea instabilităţii cromozomice.

O asemenea gena poate fi TP53. Inactivarea sa în culturile celulare este asociată cu apariţia aneuploidiei, anomalii ale fusului de diviziune şi cu blocarea progresiei prin ciclul celular la nivelul punctului de control G2/M. Pe de altă parte, există însă şi linii celulare cu mutaţii ale genei TP53 care sunt diploide. Mai mult, mutaţia TP53 este un eveniment tardiv în evoluţia majorităţii cancerelor, în timp ce aneuploidia apare precoce. Toate aceste rezultate sugerează că TP53 poate exacerba instabilitatea cromozomică, dar este puţin probabil să fie o cauză primară a acesteia.

Teoretic, genele implicate în producerea aneuploidiei pot controla condensarea cromozomilor, coeziunea cromatidelor surori, funcţia şi structura kinetocorilor şi centrosomilor, ori dinamica microtubulilor.

Un prim punct de control este reglarea activităţii *fusului de diviziune* care preîntâmpină separarea cromatidelor surori înainte de alinierea corespunzătoare a cromozomilor la nivelul fusului mitotic. Astfel, reducerea expresiei genei MAD2L1 (cromosomul 4q27) – evidenţiată în numeroase cancere mamare – este asociată cu instabilitate cromozomică tradusă prin aneuploidie.

MAD2L1 codifică o proteina cu 205 aminoacizi care se ataşează la nivelul cromosomilor nefixaţi pe fibrele fusului de diviziune, inhibând activitatea complexului de promovare a anafazei. Mutaţiile BUB1 şi BUBR1 care controlează activitatea fusului de diviziune induc aneuploidie în unele cancere colorectale. In sfârşit, mutaţiile securinei şi separinei, două proteine implicate în prevenirea separării premature a cromatidelor surori în cursul mitozei, pot conduce la instabilitate cromosomică.

O a doua cauză potenţială a aneuploidiei implică funcţia anormală a *centrosomilor*. In multe tipuri de cancere umane, cum sunt cele de sân, plămân, colon sau prostata au fost evidenţiate fusuri de diviziune multipolare sau un număr anormal de centrosomi. Până în prezent au fost identificate câteva gene care controlează activitatea centrosomilor şi anume cele care codifică kinazele CDK2, STK15 ori PLK1.

Recent au fost aduse dovezi care susţin rolul proteinei APC în inducerea instabilităţii cromosomice. Domeniul C-terminal al acestei proteine interacţionează cu proteina EB1 asociată extremităţilor citoplasmatice ale microtubulilor fusului de diviziune. Complexul APC-EB1 pare a fi crucial pentru captarea kinetocorilor şi stabilizarea interacţiunilor microtubuli-kinetocori.

In pofida acestor date, bazele moleculare ale instabilităţii cromosomice rămân necunoscute în cazul majpritătii cancerelor umane. Este evident caracterul heterogen al substratului acestui fenotip, cu numeroase gene implicate fiecare într-o mică parte a cancerelor.

2. ANOMALII CROMOZOMICE STRUCTURALE

Cea mai frecventă categorie de anomalii cromozomice structurale întâlnite în cancerele umane este cea a translocaţiilor. Pot fi evidenţiate două categorii majore de anomalii structurale: tipul complex şi tipul simplu.

Tipul complex este observat în special în tumorile solide şi constă în rearanjări complicate ce interesează mai mulţi cromozomi. Caracterizarea lor este posibilă adeseori numai prin metode bazate pe hibridizarea fluorescentă in situ (FISH) ori hibridizarea genomică comparativă (CGH). O consecinţă frecventă a unor asemenea rearanjări complexe este apariţia *cromosomilor marker*, întâlniţi frecvent în tumorile solide. De asemeni, pot rezulta adeseori pierderi ale unor fragmente cromosomice mari (traduse la nivel molecular prin pierderea heterozigozităţii), câştiguri de material genetic ori generarea unor noi produşi genici.

Bazele moleculare ale apariţiei anomaliilor cromosomice de structură sunt încă incomplet înţelese. O ipoteză atractivă este însă apariţia acestora ca urmare a declanşării premature a mitozei, înaintea reparării rupturilor ADN bicatenare care promovează recombinarea. Gene candidate a media această formă de instabilitate cromosomică sunt ATM, ATR, BRCA1, BRCA2, TP53, NBS, KU70, KU80 şi alte componente implicate în repararea rupturilor ADN bicatenare sau care reglează punctele de control ale calităţii acestui proces.

Tipul simplu de anomalii cromosomice de structură este caracterizat prin apariţia unor rearanjări care implică segmente cromozomice adeseori specifice pentru anumite tipuri de neoplazii. Ele apar mai frecvent în leucemii şi limfoame ca şi în unele tipuri de sarcoame sau forme rare de cancer (tabelul 17.2.). Datorită specificităţii lor, identificarea acestor forme de anomalii cromosomice poate fi utilizată pentru clasificarea neoplasmelor şi pentru predicţia răspunsului lor terapeutic. Analizele moleculare ale unor asemenea anomalii cromosomice au condus la identificarea unor noi gene, implicate în dezvoltarea cancerelor, în special oncogene. Aceste rearanjări conduc în general la activarea oncogenelor prin repoziţionarea lor lângă un promotor puternic sau prin fuziunea cu o altă genă activă. Asemenea rearanjări specifice par să fie esenţiale pentru dezvoltarea sau progresia cancerelor în care apar.

Tabelul 17.2. Anomalii cromosomice de structură specifice pentru unele cancere umane

Neoplazia	Anomalia cromosomică	Genele implicate
leucemia mieloidă cronică	t(2; 22)(q34; q11)	BCR-ABL
leucemia acută limfoblastică	t(1;19)(q23; p13.3)	E2A-PBX1
leucemia acută promielocitară	t(15; 17)(q22; q12)	PML-RARA
limfomul Burkitt	t(8; 14)(q24; q32)	MYC
sarcomul Ewing	t(11; 22)(q24; q12)	EWS-FLI1
liposarcomul mixoid	t(12; 16)(q13; p11)	FUS-CHOP
rabdomiosarcomul alveolar	t(2; 13)(q35; q14)	PAX3-FKHR

Spre deosebire de tipul complex, tipul simplu de rearanjări cromosomice nu pare să fie rezultatul unei instabilităţi genetice care să promoveze apariţia lor cu o frecvenţă mai crescută decât în celulele normale. De fapt, multe dintre aceste anomalii structurale reprezintă aberaţii ale unor procese normale de recombinare, precum cele promovate de protinele RAG care intervin în rearanjări genelor ce codifică imunoglobulinele sau receptorii TCR.

3. AMPLIFICĂRILE GENICE

Amplificările genice sunt evidenţiate citogenetic sub forma *regiunilor colorate omogen* (*homogeneously stained regions* - HSR) ori a *cromosomilor minusculi* (*double minutes* – DMIN) (figura 17.4). Ampliconii rezultaţi conţin 0,5 - 10 megabaze ADN. Rezultatul îl reprezintă apariţia a zeci sau sute de copii ale unei singure gene, în general protooncogene sau gene

implicate în rezistenţa la agenţi antitumorali. Amplificarea genică este un fenomen întâlnit în numeroase tipuri de cancere: colorecatale, de sân, cancerele capului şi gâtului sau în neuroblastoame. Fenomenul este asociat în special fazelor avansate de boală şi implică un prognostic nefavorabil. Câteva exemple sunt amplificarea N-MYC în 30% din neuroblastoamele avansate, ori amplificarea ERBB2 (HER2/neu) în cancerele mamare avansate.

Mecanismele care conduc la apariţia amplificărilor genice sunt în cea mai mare parte necunoscute. O cauză potenţială este mutaţia genei TP53, deoarece amplificările genice apar mult mai frecvent în celulele cu această genă inactivată. Oricum, bazele moleculare sunt cu siguranţă mai complexe, întrucât fenomenul poate apare şi în celulele tumorale cu gena TP53 integra.

C. EVOLUŢIA MULTISTADIALĂ A CANCERELOR

Cu puţine excepţii, cancerele se dezvoltă dintr-o singură celulă somatică şi din urmaşii acesteia. In cursul evoluţiei neoplazice clona acumulează o serie de modificări genetice şi epigenetice care determină modificări fenotipice majore, în final luând naştere o populaţie de celule care scapă mecanismelor de control al creşterii şi proliferării celulare, rezultatul fiind dezvoltarea unui cancer.

Conform modelului Weinberg, transformarea unei celule normale într-o celulă canceroasă necesită 6-7 mutaţii succesive. Rata tipică a mutaţiilor este însă 10^{-7} per genă şi per celulă. Ca urmare, probabilitatea apariţiei a 7 mutaţii succesive într-o singură celulă din cele circa 10^{13} ale unui organism uman ar fi extrem de redusă: $10^{13} \times 10^{-42} = 10^{-29}$. Frecvenţa crescută a cancerelor poate fi explicată prin intervenţia a două mecanisme:

- unele mutaţii exacerbează capacitatea de proliferare celulară, determinând naşterea unei populaţii crescute de celule ţintă pentru mutaţiile următoare (figura 17.5);
- unele mutaţii determină instabilitatea întregului genom, crescând rata globală a mutaţiilor.

Exacerbarea capacităţii proliferative este consecinţa mutaţiilor proto-oncogenelor ori a genelor supresoare de tumori (subclasa *gatekeeper*), care permit:

- producerea autosuficientă a semnalelor necesare creşterii celulare;
- insensibilitatea la stimulii care se opun creşterii;
- sustragerea de sub controlul mecanismelor apoptozei;
- potenţial replicativ nelimitat.

Instabilitatea genetică îmbracă cele două forme majore discutate anterior:

- instabilitatea microsateliţilor (MIN) determinată de mutaţii ale genelor implicate în repararea erorilor de împerechere;
- instabilitatea cromosomică (CIN) determinată de mutaţii ale genelor care controlează diverse componente ale aparatului mitotic.

Intre cele două forme de instabilitate genetică există o corelaţie inversă aşa cum se observă de exemplu în cancerele colorectale sau endometriale. Cancerele cu MIN sunt în general diploide, iar cancerele aneuploide au în general mecanisme eficiente de reparare a erorilor de împerechere. Ambele forme de instabilitate genetică par a fi însă evenimente precoce în dezvoltarea tumorală.

In cadrul *evoluţiei multistadiale* a cancerelor unele evenimente sunt întâlnite aproape obligatoriu. Acestea sunt: imortalizarea (dobândirea capacităţii de proliferare nelimitată), apariţia unor modificări epigenetice, mutaţii ale genomului mitocondrial, angiogeneza, invazia şi metastazarea.

1. IMORTALIZAREA CELULELOR TUMORALE

Celulele normale ale organismului uman pot suferi un număr limitat de diviziuni (limita

Hayflick) după care intră într-un stadiu numit senescenţa replicativă. Acest fapt se datorează scurtării progresive a telomerelor, care este rezultatul caracterului asimetric al replicării celor două catene ale ADN.

Telomerele umane sunt alcătuite dintr-o repetiţie hexanucleotidică (TTAGGG)n. Fiecare replicare este asociată cu pierderea a aproximativ 35 perechi de baze ale acestei repetiţii ADN. Pentru a evita acest fenomen şi a permite numărul imens de diviziuni celulare necesar în cursul embriogenezei, organismul uman este prevăzut cu un sistem special de replicare a telomerelor care implică activitatea unui complex ARN-proteine numit *telomeraza*. Principala componentă proteică a acestui complex este TERT (cromosomul 5p15.33). După perioada embrionară telomeraza este inactivata în majoritatea ţesuturilor, ramânând activă numai în celulele cu replicare intensă cum este linia celulelor germinale.

S-a constatat că aproximativ 90% din cancerele umane au însă telomeraza reactivată. Reactivarea telomerazei poate fi indusă de către oncogena MYC sau de către oncogena E6 a *virusului Papilloma*. Reactivarea telomerazei nu este însă suficientă pentru imortalizare, un alt eveniment necesar fiind inactivarea căii P16-RB-E2F1 de control a ciclului celular.

Aproximativ 10% din cancerele umane sunt însă capabile să menţină lungimea normală a telomerelor şi capacitatea de proliferare necontrolată în absenţa reactivării telomerazei. Recent s-a stabilit că această trăsătură poate fi rezultatul mutaţiei genelor care intervin în repararea erorilor de împerechere (MMR). Aceste gene sunt necesare pentru evitarea mutaţiilor şi pentru represia recombinării omologe. Cum secvenţele telomerice nu sunt perfect omologe, alterarea funcţiei acestor gene poate conduce la recombinări între capetele cromosomice care pot avea ca rezultat menţinerea lungimii telomerelor şi, ca urmare, a capacităţii de proliferare. Pe de alta parte, deoarece mutaţiile genelor MMR cresc rata mutaţiilor, creşterea capacităţii de proliferare telomeraza-independentă poate fi secundară apariţiei unor mutaţii la nivelul genelor care influenţează recombinarea telomerelor. De exemplu, unele mutaţii ale ADN-polimerazei δ pot avea consecinţe asemănătoare.

Una dintre caracteristicile constante ale liniilor celulare imortalizate este aneuploidia. Semnificaţia şi bazele moleculare ale acestei asocieri sunt însă incomplet cunoscute.

2. MODIFICĂRI EPIGENETICE ÎN CANCER

Expresia genelor poate fi reglată nu numai prin evenimente genetice cum sunt mutaţiile ori deleţiile, ci şi prin modificări epigenetice. Principala modificare epigenetică răspunzătoare de alterarea expresiei genice este *metilarea regiunilor promotor*. Metilarea ADN uman apare la nivelul poziţiei 5' a citozinei din cadrul dubletelor CpG[8]. Hipermetilarea este asociată cu un proces de dezacetilare a histonelor, iar rezultatul este modificarea conformaţiei structurale a cromatinei. Hipermetilarea aberantă este o caracteristică frecvent întâlnită în cadrul cancerelor umane şi este asociată adeseori cu inactivarea unor gene supresoare de tumori.

Acest mecanism de inactivare este frecvent în mod particular în cazul unor gene precum: APC, BRCA1, CDH1, LBK1, MLH1, P16 ori VHL, dar nu în formele familiale de boala ci în cele sporadice. Lista genelor hipermetilate în cancer include, de asemenea, o serie de gene care nu au activitate pe deplin documentată de supresie a creşterii tumorale (de exemplu, pierderea expresiei genei O6-MGMT care protejează împotriva mutaţiilor G-A).

Cum hipermetilarea se poate accentua o dată cu proliferarea celulară, aceasta poate conduce la grade diferite de inactivare a expresiei genice, spre deosebire de inactivarea produsă de mutaţiile genice. Pe de altă parte, hipermetilarea poate fi potenţial reversibilă şi acestui fapt i se atribuisemnificaţii particulare în cazul unor gene. De exemplu, în unele forme de cancer inactivarea prin hipermetilarea promotorului genei CDH1 (care codifică caderina E – o proteină implicată în adeziunea celulară) este un eveniment precoce care ar favoriza invazia tumorală. Pe de alta parte, formarea unor agregate celulare care să permită supravieţuirea celulelor metastazate

[8]Metilarea ADN poate apare, mai rar, în cadrul altor secvenţe precum CpNpG ori CmC[A/T]GG.

poate necesita reexprimarea caderinei E, obţinută prin reducerea regională a metilării promotorului său.

Modificarea epigenetică a expresiei genice în cancerele umane este întâlnită, de asemenea, în cazul unor *gene amprentate*. Aceste gene sunt exprimate în mod normal monoalelic şi cu specificitate parentală (fie numai de pe cromosomii paterni – de exemplu IGF2, fie numai de pe cromosomii materni – de exemplu H19), iar tulburările metilării unor regiuni bogate în dinucleotide CpG din structura lor pot conduce la exprimarea aberantă, bialelică. Acest fenomen denumit *pierderea amprentării* (“*loss of imprinting” - LOI*) este întâlnit frecvent în cazul genei IGF2 în unele cancere, cum sunt tumorile Wilms ori tumorile colorectale. In cancerele colorectale LOI pentru gena IGF2 este asociată în mod particular cu inactivarea prin hipermetilare a genei MLH1 şi, ca urmare, cu instabilitatea microsateliţilor (MIN).

Deşi hipermetilarea promotorului este clar implicată în inactivarea genelor supresoare de tumori, există şi alte mecanisme prin care metilarea anormală poate fi implicată în tumorigeneza. Astfel, modelele experimentale au arătat că statusul heterozigot pentru gena DNMT1, răspunzătoare de menţinerea metilării ADN, se asociază cu creştere a frecvenţei mutaţiilor somatice.

3. MUTAŢII ALE ADN MITOCONDRIAL

Genomul mitocondrial este mai vulnerabil la alterările oxidative şi suferă o rată mai înaltă a mutaţiilor decât genomul nuclear. Tumorile prezintă adeseori mutaţii ale ADNmt. Asemenea alterări au fost identificate în cancerele de vezică urinară, sân, colon, cap şi gât, rinichi, ficat, stomac, în leucemii şi limfoame.

Rata crescută a mutaţiilor la nivelul genomului mitocondrial poate fi explicată prin trei factori:

- localizarea în apropierea lanţului de transport al electronilor care generează o concentraţie crescută a speciilor reactive de oxigen;
- existenţa unor capacităţi limitate de reparare a leziunilor ADN-ului mitocondrial în raport cu cel nuclear;
- absenţa protecţiei asigurate de histone şi de organizarea sub forma fibrelor de cromatină.

Deoarece ADNmt nu conţine introni, majoritatea mutaţiilor apar la nivelul secvenţelor codante.

Fiecare tip de cancer analizat pare să conţină un model caracteristic al mutaţiilor ADNmt. Aceasta conduce la ideea ca aceste mutaţii ar putea fi un component esenţial în evoluţia tumorilor.

Există mai multe explicaţii posibile ale modului în care aceste mutaţii ar putea interveni în evoluţia multistadială a cancerelor:

- una dintre consecinţe ar putea fi creşterea producţiei radicalilor liberi de oxigen care sporeşte şi mai mult rata mutaţiilor;
- accentuarea capacităţii de glicoliză anaeroba care este o caracteristică comună tuturor celulelor tumorale. Cantitatea de ATP astfel produsă este însă mai mică decât în celulele normale, ceea ce ar avea consecinţe asupra capacităţii acestor celule de a traversa ciclul celular şi de a-şi repara leziunile ADN;
- inserţia unor fragmente ale ADNmt în interiorul genelor nucleare ar putea fi o cauză a activării unor oncogene. Astfel de fragmente ale genelor ND4, citocromului c, oxidazelor I, II şi III au fost identificate în mai multe cazuri în interiorul unor gene nucleare.

4. ANGIOGENEZA TUMORALĂ

In organismele mature angiogeneza este suprimată în cea mai mare parte şi numai 0,01% din celulele endoteliale suferă procese de diviziune celulară. Celulele tumorale secretă multipli factori angiogenetici, dar şi numeroase enzime care facilitează eliberarea unor factori

angiogenetici situaţi în matricea extracelulară. Printre factorii angiogenetici secretaţi de celulele tumorale, cei mai importanţi sunt VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF1 şi FGF2 (fibroblast growth factor). Ei sunt inhibaţi de către o serie de factori antiangiogenetici precum trombospondinele 1 şi 2 (TSP1 şi TSP2) ori interferonul ß (IFNB).

Toţi aceşti factori se află sub controlul unor oncogene şi gene supresoare de tumori. De exemplu, pierderea funcţiei TP53 care apare în majoritatea tumorilor poate determina reducerea nivelelor trombospondinei-1. De asemeni, activarea oncogenei RAS sau pierderea funcţiei genei supresoare de tumori VHL în anumite tipuri tumorale conduce la hiperexprimarea VEGF.

5. INVAZIA ŞI METASTAZAREA

Aceste procese sunt mediate de proteine care determină modificări ale interacţiunilor fizice ale celulelor la nivelul micromediului lor specific (receptori şi liganzi) şi activarea unor proteaze extracelulare. Aceşti factori sunt extrem de diverşi, câţiva dintre cei mai studiaţi fiind: CD44 – esenţial pentru apariţia metastazelor în osteosarcoame, osteospondina în cancerele mamare, fosfataza PRL3 în cancerele colorectale, ICAM1 în melanoamele maligne etc.

Au fost evidenţiate de asemeni gene care inhibă potenţialul de metastazare al unor tumori. Cea mai intens studiată a fost gena NM23 care codifică o proteină cu activitate de nucleozid difosfat kinaza. Reducerea expresiei acestei proteine este asociată cu creştere a agresivităţii cancerelor de sân şi a melanoamelor. Alte asemenea proteine sunt caderina E în cazul cancerelor de cap şi gât, prostata sau a cancerelor tractului genital feminin, gena KISS1 în melanoamele maligne, gena BRMS1 în cancerele mamare etc.

Expresia ambelor categorii de gene mai sus amintite se află de asemeni sub controlul oncogenelor şi a genelor supresoare de tumori, dar aceste mecanisme de reglare sunt în cea mai mare parte necunoscute. De exemplu, activitatea CD44 poate fi stimulată de către expresia unei oncogene RAS, osteospondina poate fi stimulată de către oncogenele SRC, MOS, RAF, FES etc.

6. MODELE DE EVOLUŢIE MULTISTADIALĂ A CANCERELOR

Nu există seturi specifice de gene ale caror mutaţii să conducă la dezvoltarea unui anumit tip de cancer. Cu toate acestea, necesitatea expansiunii clonale şi a instabilităţii genetice impune o anumită regularitate a modificărilor întâlnite. Mutaţiile genetice întâlnite în etapa iniţială (de inducţtie) pot fi în mod particular mult mai specifice decât cele ulterioare, din cadrul progresiei tumorale.

Uneori relaţia cauzală dintre o anumită modificare genetică şi tipul particular de cancer în care apare aceasta este una logică. De exemplu, translocaţiile oncogenei MYC la nivelul unui locus Ig este logic să inducă perturbări ale celulelor care exprimă imunoglobulinele la un nivel foarte crescut. Alteori însă, nu există nici o asemenea conexiune aparentă. De exemplu, cauzele care conduc la dezvoltarea unor forme particulare de cancer ca urmare a mutaţiilor unor gene ce codifică proteine esenţiale pentru activitatea tuturor celulelor (precum retinoblastoamele în cazul mutaţiei RB) sunt încă obscure. O posibilă explicaţie se găseşte în ipoteza genelor *gatekeeper* (Kinzler şi Vogelstein, 1996), conform căreia fiecare tip celular este caracterizat printr-o genă particulară răspunzătoare de controlul proliferării şi de menţinerea homeostazie tisulare. Mutaţia acestei gene *gatekeeper* conduce la un dezechilibru între rata diviziunilor şi a morţii celulare, în timp ce mutaţiile altor gene nu au nici un efect pe termen lung dacă gena *gatekeeper* este integra funcţional.

Genele supresoare de tumori identificate prin studiul cancerelor ereditare sunt astfel de gene *gatekeeper* pentru ţesuturile respective: NF1 pentru celulele Schwann, VHL pentru celulele renale, APC pentru celulele epiteliale intestinale etc. Motivul pentru care gene larg exprimate sunt *gatekeeper* numai pentru un anumit tip celular

rezidă probabil în diferenţele care există între reţelele complexe de semnalizare ale variatelor tipuri celulare, diferenţe care fac ca o anumită genă să aibă un rol dominant într-un anumit tip celular. Pentru cancerele care nu au echivalent mendelian este posibilă şi existenţa mai multor gene *gatekeeper*.

Prima formă de cancer pentru care a fost postulată secvenţa evenimentelor genetice răspunzătoare de evoluţia multistadială a fost cancerul colorectal (modelul Fearon şi Vogelstein, 1990 – figura 17.6). Acestea nu sunt singurele modificări genetice întâlnite în cancerele colorectale, dar sunt cele mai frecvent asociate cu un anumit stadiu evolutiv. Modele asemănătoare au fost construite şi pentru alte forme de cancer.

D. PREDISPOZIŢIA GENETICĂ ÎN CANCER

Principala trăsătură care permite recunoaşterea clinică a existenţei unei predispoziţii genetice este istoricul familial pozitiv. Cancerul este însă o afecţiune frecventă şi, ca urmare, în unele familii se pot înregistra câteva cazuri, aparenta agregare familială fiind întâmplătoare. Predispoziţia genetică poate îmbrăca un spectru larg, de la existenţa unor forme rare de cancere ereditare până la cancere cu predispoziţie genetică, dar fără istoric familial sugestiv (tabelul 17.3).

In mod paradoxal cea mai largă categorie de cancere cu predispoziţie genetică în ceea ce priveşte incidenţa globală este cea fără agregare familială evidentă. De exemplu, în cazul cancerelor de sân şi ovar, formele ereditare asociate mutaţiilor genelor BRCA1 şi BRCA2 (care induc un risc de 60-80% până la vârsta de 70 de ani) reprezintă sub 5% din total. În schimb, o alelă care ar induce un risc relativ egal cu 2 faţă de populaţia generală şi care ar avea o frecvenţa de circa 20% în populaţie ar putea fi răspunzătoare de până la 20% din incidenţa acestor cancere.

Tabelul 17.3. Tipuri de predispoziţie genetică în cancer

Tipul	Incidenţa globală	Trăsături clinice	Frecvenţa alelelor	Riscul indus
Cancere ereditare	1-2%	Cancere rare sau combinaţii specifice de cancere. Uneori asocierea unor anomalii congenitale sau modificări fenotipice nonneoplazice. Transmitere mendeliană dominantă sau, mai rar, recesivă.	Rară: ~1 la 1000 sau mai puţin	Crescut: 50-80% sau chiar mai mare.
Cancere familiale	~ 10%	Familii cu câteva cazuri de cancere comune adeseori asociate specific (de exemplu: sân + ovar, colon + endometru + tract urinar). Există un spectru larg de situaţii, de la familii cu numeroase cazuri şi debut precoce (dovada unei predispoziţii puternice) până la familii cu 2-3 cazuri cu debut la vârste mai înaintate. Transmiterea îmbracă în general modelul unei boli dominante cu penetranţa incompletă.	Rară până la frecventă.	Moderat sau redus.
Predispoziţie genetică fără dovada unei agregări familiale	Nu poate fi apreciată exact. Posibilă în multe cancere	Cazuri singulare ce pot apare în orice sediu, uneori cu una sau două rude afectate. Distribuţia acestor cazuri în populaţie este determinată probabil de combinarea efectelor unor factori de risc genetici şi de mediu.	Multiple alele comune	Redus

1. CANCERELE EREDITARE

Se cunosc aproximativ 50 de afecţiuni cu transmitere mendeliană care se asociază un risc foarte crescut pentru dezvoltarea unor forme specifice de cancer (tabelul 17.4). Studiul acestor boli a permis identificarea unor gene care sunt implicate şi în formele sporadice de cancer.

Majoritatea acestor boli sunt transmite dominant, dar există şi sindroame cu transmitere recesivă. Se cunosc doar două boli determinate de moştenirea unei mutaţii germinale la nivelul unor oncogene, celelalte fiind asociate mutaţiilor unor gene supresoare de tumori.

Tabelul 17.4. Sindroame cu transmitere ereditară a riscului de dezvoltare a cancerelor

Sindromul	Tumora primară	Alte cancere sau modificări fenotipice asociate	Gena	Localizare	Funcţia produsului genic
Cancere transmise AD produse de mutaţii germinale cu activarea unor oncogene					
Carcinomul renal papilar ereditar	cancer renal		MET	7q31	receptor transmembranar pentru factorul de creştere hepatocitar (HGF)
Neoplaziile endocrine multiple tip 2 (MEN2)	cancer medular tiroidian	Tipul 2A: feocromocitoame; hiperplazia paratiroidelor Tipul 2B: feocromocitoame; hamartoame ale mucoasei bucale şi linguale	RET	10q11.2	receptor transmembranar tirozin kinazic pentru GDNF, artemina, neurturina şi persefina
Cancere transmise AD produse de mutaţii germinale ce inactiveaza gene supresoare de tumori					
Retinoblastom familial	Retinoblastoame	osteosarcoame	RB1	13q14.3	reglator al ciclului celular şi al transcripţiei
Sindromul WAGR	tumori Wilms	anomalii genitale, aniridie, retard mintal	WT1	11p13	represor al transcripţiei
von Hippel-Lindau	cancere renale cu celule clare	feocromocitoame, angioame retiniene, hemangioblastoame	VHL	3p25	reglator al translaţiei
Carcinoamele nevoide bazocelulare	carcinoame cutanate bazocelulare	chisturi bucale, pistrui palmo-plantari, meduloblastoame, fibroame ovariene	PTCH	9q22.3	receptor transmembranar pentru semnalizarea prin moleculele *Hedgehog*
Boala Cowden	cancer de sân,tiroidian	polipi intestinali	PTEN	10q23.3	fosfataza
Sindromul Peutz-Jeghers	cancere intestinale	cancere ovariene, cancere testiculare	STK11	19p13.3	serin-treonin kinaza
Polipoza colonica juvenila	cancere gastro-intestinale	cancere pancreatice, malformaţii cardiace, despicături labiale sau palatine, macrocefalie	SMAD4 BMPR1A	18q21.1 10q22.3	mediator citoplasmatic al semnalizarii pe calea TGF-β receptor serin-treonin kinazic
Melanomul familial	melanoame	cancere pancreatice, nevi displazici, mole atipice	CDKN2A CDK4	9p21 12q14	inhibitor al kinazelor CDK4/6 ce promovează tranziţia G1-S a ciclului celular protein kinaza ce stimulează diviziunea celulară
Neurofibro-matoza tip 1	Neurofibroa-me	neurofibrosarcoame, tumori cerebrale	NF1	17q11.2	reglarea proteinelor G RAS-like
Neurofibro-matoza tip 2	neurinoame acustice, meningioame	glioame, ependimoame, mezotelioame	NF2	22q12.2	legătura între proteinele membranare şi proteinele citoscheletului
Scleroza tuberoasă	hamartoame cancere renale, astrocitoame	rabdomioame, autism, epilepsie	TSC1 TSC2	9q34 16p13	reglarea ciclului celular şi a apoptozei, menţinerea citoscheletului
Polipoza adenomatoasă familială	cancere colorectale	tumori duodenale şi gastrice, anomalii retiniene, tumori ale cavităţii bucale, osteoame şi tumori desmoide, meduloblastoame şi glioblastoame (in sdr. Turcot)	APC	5q21	reglarea cateninei ß, component al citoscheletului celular

Sindromul	Tumora primară	Alte cancere sau modificări fenotipice asociate	Gena	Localizare	Funcţia produsului genic
Cancerul gastric familial	cancer gastric		CDH1	16q22	caderina E implicată în adezivitatea celulară
Neoplaziile endocrine multiple tip 1 (MEN 1)	tumori pancreatice (insulele Langerhans	hiperplazia paratiroidelor, adenoame pituitare	MEN1	11q13	menina interacţionează cu factorul de transcripţie JUND pe care îl reprimă
Sindromul Li-Fraumeni	sarcoame, cancere de sân	tumori cerebrale, leucemii	TP53 CHK2		factor de transcripţie, răspuns la alterările ADN şi rol în inducerea apoptozei protein kinaza activata ca răspuns la alterările ADN
Cancerul de sân şi ovar ereditar	cancere de sân	cancere ovariene cancere pancreatice, cancere de sân la bărbaţi	BRCA1 BRCA2	17q21 13q12	repararea rupturilor ADN bicatenare, controlul transcripţiei repararea rupturilor ADN bicatenare
Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (HNPCC)	cancere colorectale	cancere endometriale, ovariene, hepatobiliare şi vezicale, glioblastoame (sindromul Turcot)	MSH2 MLH1 PMS2 PMS1 MSH6 MSH3 MLH3	2p21 3p21 2q31.1 7p22 2p16 5q11-q12 14q24.3	repararea erorilor de împerechere ADN; menţinerea stabili-tăţii repetiţiilor simple în tandem ale ADN
Cancere transmise AR produse de mutaţii ce inactivează gene supresoare de tumori					
Ataxia-telangiectazia	limfoame	degenerare cerebelară, sterilitate, imunodeficienţa	ATM	11q22	semnalizarea erorilor ADN
Sindromul Bloom	tumori solide	imunodeficienţa, hipostatu-ră, anomalii pigmentare, fo-tosensibilitate, infertilitate, instabilitate cromosomică	BLM	15q26.1	ADN-helicaza
Xeroderma pigmentosum	cancere cutanate	fotosensibilitate, hipogona-dism, uneori neurodegene-rare şi retard mintal	XPB XPD XPA XPC XPF XPE XPG	2q21 19q13 9q22.3 3p25 16p13 11p11-p12 13q33	componente ale maşinăriei de repa-rare ale leziunilor ADN induse de ra-diaţiile UV, prin mecanismul de ex-cizie a nucleoti-delor (NER)
Anemia Fanconi	leucemii	pancitopenie, hipoplazia ra-diusului, instabilitate cro-mosomică, uneori anomalii cardiace şi renale	FANCA FANCC FANCD FANCE FANCG FANCF	16q24.3 9q22.3 3p25.3 6p22-p21 9p13 11p15	componente ale maşinăriei de repa-rare a legăturilor ADN încrucişate

In prezent testarea genetică pentru identificarea persoanelor cu risc din cadrul acestor familii este parte a managementului standard pentru unele dintre aceste sindroame (neoplaziile endocrine multiple tip 2, boala von Hippel-Lindau, retinoblastomul familial sau polipoza adenomatoasă familiala (vezi subcapitolul D 1.5) . Pentru alte sindroame, cum sunt cancerele de sân şi ovar ereditare (vezi subcapitolul D 1.6), cancerul colorectal nonpolipozic ereditar ori sindromul Peutz-Jeghers testarea genetică este probabil benefică. În sfârşit, în alte sindroame, ca de exemplu sindromul Li-Fraumeni ori melanomul ereditar testarea genetică fie nu este disponibilă, fie nu este de natură să modifice managementul medical.

Doua trăsături importante ale cancerelor din cadrul acestor sindroame sunt specificitatea

tisulară şi expresia variabilă. Toate cancerele ereditare par să prezinte un grad crescut de *specificitate tisulară*, deşi nu există nici o explicaţie fiziologică bine fundamentată pentru aceasta (vezi şi subcapitolul 17.C). De asemenea, pare să existe o variabilitate substanţială în ceea ce priveşte vârsta de debut şi tipul specific de cancer ce predomină în cadrul unor familii. Aceste variaţii pot fi datorate unor mutaţii diferite în cadrul aceleeaşi gene (de exemplu în boala von Hippel-Lindau, polipoza adenomatoasă familială, MEN2), dar şi intervenţiei unor gene modificatoare ori a unor factori de mediu. Un interes particular îl au genele modificatoare care reduc penetranţa mutaţiilor genelor cauzatoare, atât pentru aprecierea corectă a riscului, cât şi pentru dezvoltarea posibilă a unor noi metode de prevenţie şi tratament.

1.1 NEOPLAZIILE ENDOCRINE MULTIPLE TIP 2 (MEN2)

MEN2 (OMIM 171400) este o boală genetică transmisă autosomal dominant, care prezintă două variante clinice. *Varianta A* este cea mai frecventă şi este caracterizată printr-o incidenţă crescută a carcinoamelor medulare de tiroidă (cu originea în celulele parafoliculare C care produc calcitonina), asociate adeseori cu feocromocitoame şi/sau adenoame paratiroidiene benigne. *Varianta B*, mai rară, este caracterizată printr-un status marfanoid şi prin dezvoltarea tumorilor descrise în varianta A (in general cu debut mai precoce), dar şi a unor tumori benigne cu origine neurală (neurinoame) la nivelul mucoasei bucale şi al buzelor.

Mutaţiile responsabile de producerea MEN2 interesează gena RET care codifică un receptor tirozin-kinazic pentru patru liganzi: factorul de creştere derivat din celulele gliale (GDNF), neurturina, artemina şi persefina. Legarea acestor liganzi produce dimerizarea receptorului care suferă o serie de modificări conformaţionale răspunzătoare de activarea proprietătilor kinazice. Rezultatul este fosforilarea altor proteine intracelulare, cu declanşarea unei cascade de interacţtiuni interproteice şi ADN-proteine. Mutaţiile aceleiaşi gene RET sunt responsabile de producerea bolii Hirschprung (megacolonul congenital). Spre deosebire de mutaţiile cu pierderea funcţiei responsabile de producerea bolii Hirschprung, mutaţiile RET din cadrul MEN2A şi MEN2B sunt mutaţii punctiforme care activează receptorul şi permite acestuia să fosforileze tirozinele proteinelor ţintă în absenţa cuplării liganzilor.

Indivizii care au moştenit o mutaţie activatoare a RET au un risc de aproximativ 60% de a dezvolta carcinoame medulare de tiroidă simptomatice. În MEN2B peste 95% din mutaţii sunt localizate la nivelul exonului 16 (M918T) sau a exonului 15 (A883F). În MEN2A mutaţiile sunt diferite şi interesează codonii pentru reziduurile cisteinice din porţiunea extramembranară a RET. MEN2 este un exemplu de boală genetică în care *testarea genetică precoce* se impune cu necesitate. Aceasta trebuie efectuată înaintea vârstei de 6 ani. Indivizii cu mutaţii prezente trebuie să beneficieze, începând cu aceeaşi vârstă, de screening biochimic pentru identificarea feocromocitomului şi a hiperparatiroidismului, precum şi de tiroidectomie profilactică. În varianta MEN2B tiroidectomia trebuie efectuată chiar mai precoce.

1.2. RETINOBLASTOMUL FAMILIAL

Retinoblastomul este o formă rară de tumoră embrionară cu origine în celulele retiniene. Incidenţa sa variază între 1 la 18.000 şi 1 la 30.000. Retinoblastoamele se dezvoltă ca tumori sporadice în 60% din cazuri sau ca o boală genetică în 40% din cazuri. In forma familială de boală (OMIM 180200) diagnosticul este de regulă mai timpuriu (în primele luni de viaţă faţă de 24-30 de luni pentru formele sporadice) şi cel mai adesea tumorile sunt bilaterale. Pacienţii care supravieţuiesc tumorii primare, ca urmare a unui diagnostic şi tratament precoce, au un risc crescut pentru dezvoltarea unor neoplazii secundare, cele mai frecvente fiind osteosarcoamele, sarcoamele de părţi moi sau melanoamele.

Forma familială de boală este rezultatul transmiterii unor mutaţii germinale ale genei supresoare de tumori RB1 localizată pe cromosomul 13q14. Această genă codifică o proteină cu rol major în controlul ciclului celular, pe calea P16-RB-E2F1 (figura 17.7).

Activitatea de reglare a ciclului celular este realizată prin intermediul proteinei E2F1, un factor de transcripţie cu care interacţionează proteina RB. In faza G1 a ciclului celular proteina RB este hipofosforilată şi aceasta permite interacţiunea sa cu E2F1, blocând activitatea de factor de transcripţie a acesteia. Sub acţiunea complexelor cilină D - CDK4/6 (activate pe căi de stimulare induse de factori de creştere) proteina RB este fosforilată, ceea ce determină eliberarea factorului E2F1 ce işi poate exercita astfel funcţia de promovare a fazei S. Activitatea de fosforilare a complexului CDK4/6 este inhibată la rândul ei de către proteina P16. Genele ţintă ale proteinei E2F1 codifică proteine implicate în replicare (ADN polimeraza α şi PCNA - antigenul nuclear de proliferare celulară, timidin kinaza, timidilat kinaza, ribonucleotid reductaza), repararea ADN (RAD51) sau controlul fazei S a ciclului celular (ciclina E, CDK2). Pe lângă activitatea de control a ciclului celular, RB intervine şi în căile de declanşare a apoptozei. Astfel, E2F1 este capabilă să inducă expresia P14 care blochează funcţia MDM2, principalul inhibitor al proteinei P53. Rezultatul este acumularea P53 care poate declanşa apoptoza.

Calea P16 - RB - E2F1 este una dintre căile majore de control al ciclului celular şi, ca urmare, o ţintă frecventă a evenimentelor mutaţionale în majoritatea cancerelor umane. Astfel, mutaţii ale RB au fost evidenţiate în diverse cancere umane: osteosarcoamele, cancerele pulmonare microcelulare, cancerele de sân etc. Mutaţii ale P16 sunt întâlnite frecvent în melanoamele maligne şi alte forme de cancere. In sfârşit, amplificări ale ciclinei D, ca şi ale CDK4 sunt întâlnite în sarcoame sau în glioame.

1.3. SINDROMUL LI-FRAUMENI

Sindromul Li-Fraumeni (OMIM 151613) este o boală genetică autosomal dominantă foarte rară (incidenţa 1 la 500.000 indivizi) caracterizată printr-un risc crescut de dezvoltare a unor cancere, în special sarcoame, cancere mamare, cerebrale, adrenocorticale, leucemii şi limfoame. Clasic, sindromul Li-Fraumeni este diagnosticat clinic atunci când: a) un pacient diagnosticat cu sarcom înainte de 45 de ani are: b) o rudă de gradul I afectată de orice formă de cancer care a debutat înainte de 45 de ani, plus c) o rudă de gradul I sau II de pe aceeaşi linie parentală diagnosticată cu orice forma de cancer înainte de 45 de ani sau cu sarcom la orice vârstă. Peste 75% dintre aceşti pacienţi dezvoltă cancere înainte de 45 de ani. De asemenea, incidenţa cancerelor multiple sincrone sau metacrone este foarte crescută, atingând 57% la 30 de ani de la diagnosticul primei neoplazii. Alte forme de cancer care pot fi diagnosticate în cadrul acestui sindrom sunt cele de stomac, plămân, colon sau melanoamele maligne.

Mutaţiile germinale ale genei supresoare de tumori TP53 (17p13) sunt responsabile de 70-85% din cazurile clasice de sindrom Li-Fraumeni. Frecvenţa acestor mutaţii atinge până la 100% în familiile în care există cel puţin un caz de carcinom adrenocortical. Mutaţiile genei CHEK2 sunt responsabile de o mică parte din cazurile de sindrom Li-Fraumeni.

Gena TP53 este probabil una dintre cele mai intens studiate datorită faptului că suferă mutaţii în peste 50% din toate cancerele umane. Proteina codificată de această genă are un rol major în supresia tumorală. Activarea P53 poate fi realizată de diverşi stimuli precum hipoxia, radiaţiile ionizante, depleţia nucleotidelor, alterări ale fusului mitotic, ori hiperexpresia unor oncogene. P53 este caracterizată drept un factor de transcripţie, activitate esenţială pentru rolul său de supresie tumorală. Câteva dintre genele-ţintă răspunzătoare de blocarea ciclului celular şi inducerea apoptozei sunt: gena pentru proteina P21 care inhibă activitatea kinazelor ciclin dependente ce promovează tranziţia G1-S, gena pentru proteina 14-3-3(sigma) care induce blocarea ciclului celular la nivelul fazei G2 prin sechestrarea fosfatazei promitotice CDC25C, ori gena BAX responsabilă de inducerea apoptozei. In absenţa stimulilor de stres, nivelul P53 este menţinut la nivele reduse prin intervenţia MDM2 (vezi figura 17.3) care promovează degradarea acesteia pe calea ubiquitinării. Stimulii de stres, ca de exemplu, radiaţiile ionizante induc fosforilarea serinei 20 a P53 prin intervenţia kinazei CHEK2, ceea ce conduce la stabilizarea P53 şi creşterea activităţii sale transcripţionale. La rândul său, MDM2 este inhibată de către proteina P14 care formează cu aceasta un complex sechestrat la nivel nucleolar. Calea de control P14-MDM2-P53 este a două cale majoră de control a ciclului celular.

Diagnosticul sindromului Li-Fraumeni este clinic, deşi există teste genetice disponibile. Impactul acestor teste genetice în managementul clinic al pacienţilor este considerat însă redus, datorită multiplelor sedii în care se poate dezvoltă un cancer. Totuşi, unele studii au evidenţiat anumite corelaţii genotip-fenotip. Astfel, mutaţiile codonului 248 par a induce un risc mai crescut pentru dezvoltarea cancerelor de sân, în timp ce mutaţia R175H este asociată frecvent cu dezvoltarea leucemiilor acute. In condiţiile în care diagnosticul mu s-a pus prin investigaţii moleculare este indicată o examinare clinică minuţioasă anuală începând cu vârsta de 20-25 de ani. Atunci când în familie apar cu predilecţie anumite forme de cancer, monitorizarea trebuie să se adreseze organelor frecvent afectate.

1.4. CANCERUL COLORECTAL NONPOLIPOZIC EREDITAR (HNPCC)

HNPCC (OMIM 114500), cunoscut şi sub denumirea de **sindromul Lynch**, este cea mai frecventă formă de predispoziţie genetică cunoscută pentru cancerul de colon. Incidenţa în populaţia generală este de 1 la 1000 şi de circa 3-6% dintre pacienţii diagnosticaţi cu neoplasm de colon. HNPCC este caracterizat printr-un risc de 80% de dezvoltare a cancerului colorectal până la vârsta de 70 de ani şi de 60% pentru cancerul endometrial la femei. Indivizii cu HNPCC au deasemeni un risc crescut pentru dezvoltarea altor cancere: gastric (13%), ovarian (12%), de intestin subţire, tract biliar, urinar, rinichi, SNC (4%). Cancerele de colon care se dezvoltă în cadrul HNPCC diferă de cele sporadice prin mai multe caracteristici: debutul mai precoce (vârsta medie fiind 44 ani), localizarea predominantă la nivelul hemicolonului drept (60-70% din cazuri), riscul crescut de dezvoltare a unor cancere de colon multiple sincrone sau metacrone, frecvenţa crescută a unor cancerelor coloide, cu infiltrat abundent limfocitar, prognosticul mai bun.

HNPCC este o afecţiune autosomal dominantă cauzată de mutaţii germinale ale genelor care intervin în repararea erorilor de împerechere – MMR.

Funcţia esenţială a acestui sistem este eliminarea erorilor de împerechere bază-bază şi a buclelor de inserţie-deleţie care apar ca urmare a fenomenului de "derapaj" a ADN-polimerazei în cursul replicării ADN. Alterarea funcţiei acestor gene are drept consecinţă esenţială apariţia unor substituţii nucleotidice (de exemplu G - T) ori câştigul sau pierderea unor scurte unităţi repetitive (tip CA) din constituţia microsateliţilor, fenomen denumit **instabilitatea microsateliţilor – MIN**. Există cel puţin şapte proteine MMR implicate în acest proces. Pentru recunoaşterea erorilor proteina MSH2 formează un heterodimer cu MSH6 (in cazul împerecherilor greşite bază-bază) sau cu MSH3 (în situaţia apariţiei unor bucle de inserţie-deleţie). Un alt heterodimer alcătuit din proteinele MLH1 şi PMS2 mediază interacţiunile dintre complexul de recunoaştere a erorii şi alte componente ale sistemului MMR. Acestea din urmă includ: antigenul nuclear de proliferare celulară (PCNA), ADN polimerazele delta şi epsilon, proteina de legare a ADN-ului monocatenar, unele helicaze. Pe lângă PMS2, MLH1 poate forma complexe şi cu alte două proteine: MLH3 ori PMS1.

Majoritatea mutaţiilor răspunzătoare de apariţia familiilor cu HNPCC (peste 85%) interesează genele MLH1 şi MSH2; mutaţiile MSH6 reprezintă până la 9% din cazuri, în timp ce mutaţiile altor gene reprezintă o minoritate a cazurilor.

Nu există corelaţii genotip-fenotip bine definite, deşi mutaţiile MSH2 par a fi asociate mai frecvent cu manifestările extracolonice decât mutaţiile MLH1. De asemeni, mutaţiile MSH6 asociază mai frecvent un debut tardiv, o incidenţa crescută a cancerelor endometriale şi un grad mai redus de instabilitate a microsateliţilor.

Instabilitatea microsateliţilor este întâlnită nu numai în HNPCC ci şi în aproximativ 15% din cancerele de colon sporadice. La fel, o parte dintre cancerele de endometru ori stomac prezintă un grad accentuat de MIN. MIN este de fapt o marcă pentru instabilitatea la nivelul întregului genom şi se asociază cu o creştere a ratei mutaţiilor de 100-1000 ori. MIN se asociază în special cu mutaţii ale unor gene importante pentru dezvoltarea cancerelor colorectale precum: TGFBR2, IGFI2R, BAX sau TCF4.

Există câteva seturi de criterii pentru diagnosticul clinic al HNPCC, printre cele mai utilizate fiind criteriile Amsterdam II (1999): a) trei rude cu cancere asociate HNPCC (colorectale, endometriale, de intestin subţire,

ureter sau pelvis renal); b) una din persoane trebuie să fie ruda de gradul I cu celelalte două; c) afectarea trebuie să includă cel puţin două generaţii; d) cel puţin unul din pacienţi trebuie să fie diagnosticat înainte de 50 de ani; e) polipoza adenomatoasă familială trebuie exclusă.

Deoarece 95% dintre cancerele de colon dezvoltate în cadrul HNPCC prezintă instabilitatea microsateliţilor, testarea acestui fenotip trebuie efectuată înaintea testelor genetice pentru identificarea unor mutaţii ale genelor MMR la toţi pacienţii care întrunesc criteriile clinice de diagnostic.

Testarea pentru MIN trebuie efectuată însă şi la alte categorii de pacienţi, cum sunt cei diagnosticati înainte de 50 de ani, cei cu o rudă de gradul I diagnosticată cu cancer de colon sau endometrial sau cei care au fost diagnosticaţi anterior cu una dintre aceste neoplazii. Conform criteriilor internaţionale MIN este definită ca fiind instabiliatea a cel puţin 2 din 5 loci testaţi sau cel puţin 30-40% din totalul locilor studiaţi. Instabilitatea la nivelul unui număr mai mic de loci este definită ca MIN grad redus. Pacienţii cu criterii clinice pentru HNPCC şi MIN trebuie să beneficieze de analize pentru identificarea unor mutaţii MMR.

Se recomandă ca persoanele din aceste familii să beneficieze de screening pentru diverse variante de cancer. Astfel, colonoscopia trebuie începută la 20-25 de ani şi efectuată la fiecare 1-3 ani. Screening-ul pentru cancerul endometrial constă în analiza citologică a aspiratelor endometriale sau ultrasonografia transvaginală şi trebuie început la 25-35 de ani, cu repetare la fiecare 1-2 ani. Screening-ul pentru cancerele gastrice sau de tract urinar trebuie recomandat numai în familiile care au avut asemenea cazuri şi constă în gastroscopie, ecografie şi analize urinare efectuate la fiecare 1-2 ani începând cu vârsta de 30-35 de ani. Opţiunea colectomiei profilactice trebuie avută în vedere atunci când sunt identificate adenoame colonice sau la diagnosticul primului cancer de colon. De asemeni, histero-salpingo-ooforectomia bilaterală poate fi efectuată profilactic, mai ales că riscul de dezvoltare a cancerelor endometriale depăşeşte la aceste femei chiar pe cel al dezvoltării cancerelor de colon.

1.5. POLIPOZA ADENOMATOASĂ FAMILIALĂ (FAP)

FAP (OMIM 175100) este o boală rară, răspunzătoare de mai puţin de 1% din cazurile de cancer de colon, caracterizată prin dezvoltarea a sute sau mii de polipi adenomatoşi de-a lungul colonului şi rectului. În absenţa colectomiei profilactice, aproape 100% din pacienţii cu FAP dezvoltă cancer de colon, majoritatea până la vârsta de 40 de ani.

Polipii adenomatoşi pot apare de asemenea la nivelul tractului gastro-intestinal superior, putând determina o creştere a riscului pentru cancerul dunodenal, în special la nivelul ampulei lui Vater (5-8%). Indivizii cu FAP au de asemeni un risc crescut pentru dezvoltarea hepatoblastoamelor în copilărie, a meduloblastoamelor (în varianta Turcot) şi a carcinoamelor papilare tiroidiene (în special la femei).

Alte manifestări fenotipice includ: dezvoltarea osteoamelor mandibulare (peste 90% din cazuri), a hipertrofiei congenitale a epiteliului pigmentar retinian – CHRPE – (58-88%), prezenţa dinţilor supranumerari sau neerupţi (33%). Tumorile desmoide apar la 5-10% din pacienţii cu FAP, sunt mai frecvente la femei şi reprezintă o cauză majoră de morbiditate şi mortalitate. Există un grad crescut de variabilitate în cadrul acestui sindrom, astfel că pacienţii pot avea orice combinaţie a acestor trăsături clinice şi cu diferite grade de severitate. Sindromul Gardner este o variantă a FAP caracterizată prin prezenţa osteoamelor şi a chisturilor desmoide.

FAP este o boală transmisă autosomal dominant, determinată de mutaţiile **genei APC** (cromosomul 5q21). Aproape o treime dintre pacienţii cu FAP au mutaţii APC de novo. 95% dintre mutaţiile germinale sunt de tip nonsens sau cu alterarea cadrului de lectură şi conduc la sinteza unei proteine trunchiate şi cu funcţii anormale. Cele mai frecvente mutaţii germinale interesează codonii 1061 şi 1309 (o treime din total). Manifestările FAP sunt corelate specific cu localizarea mutaţiei la nivelul genei APC.

Astfel, polipoza severă (cu peste 5000 polipi colorectali) apare frecvent la pacienţii cu mutaţii situate între codonii 1250 şi 1464. În contrast, forma atenuată de polipoză este atribuită unor mutaţii situate la nivelul extremităţilor 5' sau 3' ale genei, ori în regiunea de matisare alternativă de la nivelul exonului 9. CHRPE este prezenţa numai la pacienţii cu mutaţii între codonii 457 şi 1444, iar tumorile desmoide în cazul mutaţiilor

localizate între codonii 1403 şi 1578.

Gena APC codifică o proteină cu numeroase domenii funcţionale care îndeplineşte roluri importante în semnalizarea pe calea WNT, în adeziunea intercelulară, în stabilitatea citoscheletului microtubular, în reglarea ciclului celular şi, posibil, în apoptoza.

APC împreună cu axina realizează un complex care promovează fosforilarea ß-cateninei de către glicogen sintetaz-kinaza 3ß (GSK3B). Rezultatul este inducerea degradării ß-cateninei. Mutaţiile APC au efect similar cu stimularea pe calea WNT şi determină acumularea ß-cateninei în citoplasmă şi pătrunderea acesteia în nucleu unde se asociază cu factori de transcripţie din familiile TCF şi LEF, cărora le stimulează activitatea. Printre aceşti factori se numără TCF4, puternic exprimat în nucleii celulelor epiteliale intestinale. Complexul ß-catenină-TCF4 activează transcripţia mai multor gene printre care MYC şi ciclina D1 care intervin în controlul ciclului celular, conexina 43 care participă la formarea joncţiunilor intercelulare tip gap şi matrilizina – o metaloproteinază.

O dată ce este afirmat diagnosticul de FAP, rudele de gradul I ale persoanelor afectate au un risc de 50% de a fi moştenit mutaţia. Testarea genetică este considerată un standard pentru acestă boală. Este recomandat ca testarea genetică să se facă la descendenţii persoanelor afectate la vârsta de 10-11 ani, aceasta fiind şi vârsta când se recomandă începerea screening-ului clinic. Pentru familiile în care mutaţia nu este detectabilă, examenul endoscopic şi/sau oftalmologic pentru identificarea CHRPE pot ajuta la diagnosticarea rudelor cu risc teoretic. Indivizii cu FAP beneficiază de sigmoidoscopie flexibilă începând cu vârsta de 10-11 ani. Colectomia profilactică poate fi efectuată în general între 17 şi 20 de ani. În prezent sunt în curs de evaluare trialuri clinice de chemoprevenţie cu antiinflamatorii nesteroidiene. În familiile fără mutaţii APC identificate, rudele cu risc teoretic ar trebui să efectueze sigmoidoscopie anual între 11-24 ani, la fiecare 2 ani între 24-35 ani, la fiecare 3 ani între 35-44 ani şi la fiecare 3-5 ani dupa 45 de ani. Daca între timp se dezvoltă polipi, screening-ul trebuie efectuat ulterior după regulile existente în cazul persoanelor afectate.

1.6. CANCERUL DE SÂN ŞI OVAR EREDITAR

Există două asemenea sindroame (OMIM 113705 şi OMIM 600185) care sunt responsabile împreuna de apariţia a circa 2-3% din cancerele de sân şi ovar şi circa 40% din cazurile cu istoric familial pozitiv. Aceste sindroame au transmitere autosomal dominantă şi sunt determinate de mutaţiile germinale ale genelor BRCA1 (cromosomul 17q21) şi BRCA2 (cromosomul 13q12.3). Mutaţiile genei BRCA1 au o frecvenţă de circa 1/500 - 1/1000 în populaţia generală (una dintre cele mai frecvente boli genetice), în timp ce mutaţiile genei BRCA2 au o frecvenţă încă imprecis apreciată. Riscul dezvoltării unui cancer de sân la femeile purtătoare ale unor asemenea mutaţii este de 85-90% pe parcursul întregii vieţi şi de 50% până la vârsta de 50 de ani. Riscul dezvoltării unui cancer ovarian este diferit pentru cele două gene: 60% pentru BRCA1 şi 20% pentru gena BRCA2. La ambele sexe este crescut uşor riscul dezvoltării cancerelor colorectale. Bărbaţii purtători ai unei mutaţii BRCA1 sau BRCA2 au un risc de circa 8% de dezvoltare a unui cancer de prostată. În plus, mutaţiile BRCA2 generează la bărbaţi un risc de 6% de dezvoltare a unui cancer mamar (ceea ce reprezintă o creştere de peste 100 ori a riscului faţă de populaţia generală). În sfârşit, mutaţiile germinale ale genei BRCA2 cresc riscul dezvoltării cancerelor de pancreas, cap şi gât, vezica urinară, tract biliar, stomac şi a melanoamelor.

Genele BRCA1 şi BRCA2 au funcţii de gene supresoare de tumori. Proteinele codificate de aceste gene intervin în două procese majore: repararea rupturilor ADN bicatenare (interacţionând cu alte proteine, cum sunt RAD51 şi BARD1) şi în reglarea transcripţiei (prin coordonarea activităţii unor componente ale aparatului transcripţional, de exemplu ARN helicaza A şi CTIP).

Persoanele din familiile cu cazuri multiple de cancer de sân si/sau de ovar trebuie să

beneficieze de consult şi teste genetice şi, în cazul confirmării prezenţei unor mutaţii germinale BRCA1 ori BRCA2, trebuie incluse în programe de supraveghere sau de utilizare a unor măsuri profilactice.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN - 1999) recomandă ca femeile din aceste familii să înceapă autoexaminarea sânilor la vârsta de 25 de ani, ori cu cel puţin 5 ani mai devreme decât cel mai precoce cancer de sân diagnosticat în familie. Examinarea clinică a sânilor, anual ori semianual, trebuie începută la aceeaşi vârstă Pentru screening-ul cancerului ovarian se recomandă ultrasonografia transvaginală semianuală ori anuală, împreună cu dozarea markerului CA-125, începând cu vârsta de 25-35 de ani. Sunt încă discutabile o serie de măsuri profilactice chirurgicale cum ar fi mastectomia sau histero-ooforectomia. Modelele teoretice şi studiile epidemiologice sugerează că aceste metode de chirurgie profilactică descresc riscul dezvoltării celor două neoplazii, dar nu îl abolesc. Utilizarea chimioprofilaxiei cu Tamoxifen este încă în curs de evaluare. Pentru bărbaţii purtători ai unei mutaţii BRCA2 trebuie recomandate autoexaminarea sânilor, precum şi examinarea clinică şi mamografia efectuate anual. De asemeni, trebuie efectuat screening-ul pentru cancerul de prostată, deşi nu este încă foarte clar dacă metodele de screening trebuie utilizate pentru aceste cazuri mai precoce sau nu decât pentru populaţia generală.

2. CANCERELE FAMILIALE

Această formă de predispoziţie genetică este asociată cu un risc redus – moderat de dezvoltare a unor cancere şi este întâlnită în special în formele comune de neoplazii precum cancerele ginecologice sau digestive. Spre deosebire de formele ereditare în care se asociază frecvent alte modificări fenotipice nonneoplazice, în cancerele familiale singura trăsătură care poate fi recunoscută este agregarea familială. Aceasta face şi mai importantă o anamneză familială corecta. Cauzele cancerelor familiale pot fi variante alelice particulare ale aceloraşi gene implicate şi în producerea cancerelor ereditare, ori alte gene cu activitate de *caretakers*. Studiul acestei forme de predispoziţie genetică este important atât pentru implicaţiile privind sănătatea publică, cât şi pentru posibilitatea identificarii unor noi procese relevante pentru dezvoltarea cancerelor. Cercetarea acestor gene este încă într-un stadiu incipient, iar datele existente sunt încă relativ reduse. Câteva exemple identificate până în prezent sunt enumerate în tabelul 17.5. Identificarea acestor gene va fi mult accelarată de datele aduse de Proiectul Genom Uman. Principala modalitate constă în catalogarea diverselor variante ale genelor întâlnite în populaţie, asociată cu identificarea corelaţiilor existente între asemenea variante specifice şi riscul pentru anumite forme de cancer, răspunsul la tratament sau supravieţuirea. Variantele cel mai intens studiate în prezent sunt polimorfismele mononucleotidice - SNPs (single nucleotide polymorphisms), apreciate a fi de ordinul câtorva milioane în întregul genom uman.

Tabelul 17.5. Gene raportate a acţiona ca loci cu susceptibilitate redusă-moderată în diverse cancere familiale

Gena	Localizarea cromosomica	Cancerele asociate
Varianta I1307K a genei APC	5q21	cancere colorectale
Varianta E1317Q a genei APC	5q21	cancere colorectale
Varianta VNTR scurtă a genei H-RAS	11p15	cancere de sân, plămân, leucemii
Variante cu repetiţii CAG anormale ale receptorului androgenic	Xq11-q12	cancere de sân, cancere de prostată
Mutaţia cu trunchierea proteinei 1100delC a genei CHEK2	22q12.1	cancere de sân

3. CANCERE CU PREDISPOZIŢIE GENETICĂ FĂRĂ ISTORIC FAMILIAL

Deşi considerate în cea mai mare parte rezultatul intervenţiei factorilor de mediu, majoritatea cancerelor sunt incluse în prezent în categoria bolilor multifactoriale, componenta genetică şi cea de mediu având ponderi variabile de la caz la caz.

S-a observat că riscul dezvoltării cancerelor "sporadice" variază semnificativ chiar în condiţiile expunerii la aceiaşi factori de mediu. Aceasta se datorează în cea mai mare parte moştenirii unor variante ale unor gene implicate în *metabolismul substanţelor carcinogene* sau în *repararea leziunilor ADN*. Asemenea variante ale acestor gene pot intensifica sau, dimpotrivă, preveni efectele carcinogene ale diverşilor factori de mediu.

De exemplu, clasa genelor care codifică citocromii P450 (genele CYP) - de ordinul a câtorva sute în genomul uman - este răspunzătoare de detoxifierea substanţelor chimice străine. Unele dintre aceste gene CYP sunt polimorfice în populaţie şi determină variaţii în metabolizarea unor substanţe chimice. Un asemenea polimorfism bine studiat este cel al genei *CYP1A1* care codifică enzima aril hidrocarbon hidroxilaza (AAH), asociat cu susceptibilitatea la cancerul pulmonar. AHH este răspunzătoare de metabolizarea hidrocarburilor policiclice, precum cele întâlnite în fumul de ţigară, pe care le converteşte într-o forma epoxid mai uşor excretabilă din organism dar, în acelaşi timp, cu activitate carcinogenica crescută. Indivizii care prezintă o mutaţie la nivelul exonului 7 ce converteşte un reziduu izoleucinic în valina (aproximativ 10% în populaţia generală) au un risc de 8-10 ori mai mare de a dezvolta cancer pulmonar atunci când sunt expuşi la fumul de ţigară decât indivizii din populaţia generală.

Un alt polimorfism interesează un alt *citocrom P450 (CYP2D6)* răspunzător de metabolizarea debrisoquinei (agent ß-adrenergic blocant). Unii indivizi din populaţie (1-30%, în funcţie de originea etnică) au o capacitate accentuată de metabolizare a acestui drog adeseori datorită existenţei unor duplicaţii ale genei. Asemenea persoane par a fi mai predispuse la efectele carcinogenice ale fumatului sau ale altor carcinogeni ocupaţionali (azbestul, hidrocarburile policiclice aromatice). Riscul de dezvoltare a unui cancer pulmonar la fumatorii din acest subgrup este de 4 ori mai înalt decât în populaţia generală şi de 18 ori mai mare dacă se asociază expunerea frecventă la alţi carcinogeni. O asociere asemenătoare a fost evidenţiată şi pentru cancerele vezicale.

Alte variante polimorfice asociate cu creştere a riscului de dezvoltare a unor cancere ca urmare a expunerii la agenţi carcinogeni externi sunt enumerate în tabelul 17.6.

Tabelul 17.6. Polimorfisme ale enzimelor implicate în metabolizarea carcinogenilor

Gena	Localizarea cromosomică	Polimorfismul	Frecvenţa în populaţie	Cancerele implicate	Carcinogenii metabolizaţi
CYP1A1	15q22-q24	exon 7: Ile-Val	~10%	plămân, sân, colon, uter	hidrocarburi polici-clice aromatice
CYP1A2	15q22-qter	expresie crescută în absenţa mutaţiilor	30-40%	vezica, colon	nitrozamine, arilamine
CYP2D6	22q13.1	duplicaţii genice	1-30%	plămân, vezica, ficat	nitrozamine
GSTM1	1p13.3	alele nule	40-45%	colon, uter, ORL	compuşi elecrofilici
NAT2	8p23.1-p21.3	Arg197Glu, Ile114Thr, Lys268Arg	~72%	vezica, colon, ficat	amine aromatice, hidrazine

Factorii genetici modulează, de asemenea, răspunsul organismului la acţiunea radiaţiilor ionizante şi UV. Aşa cum am prezentat deja în subcapitolul 17.A.2 mutaţiile germinale ale genelor implicate în repararea leziunilor ADN determină producerea unor boli care se caracterizează printr-o creştere a riscului de dezvoltare a unor neoplazii induse de radiaţiile din mediul înconjurător. Se consideră însă că o serie de polimorfisme ale aceloraşi gene ar putea fi

răspunzătoare de o variabilitate mult mai largă a răspunsului la acţiunea acestor agenţi din mediu. Astfel, circa 1% din indivizii populaţiei generale sunt heterozigoţi pentru mutaţii ale genei ATM. Unele dintre aceste mutaţii par a creşte riscul dezvoltării unor cancere de către radiaţiile ionizante.

In sfârşit, aşa cum am arătat în cadrul capitolului 8 (ecogenetica), unii factori genetici pot influenţa susceptibilitatea organismului la dezvoltarea unor infecţii. Asemenea factori de predispozanţi operează şi în cadrul infecţiilor cu virusuri oncogenice, precum şi etapele ulterioare infecţiei, responsabile de declanşarea dezvoltării tumorale. Au fost identificaţi asemenea factori de predispozanţi. De exemplu, un polimorfism la nivelul promotorului IL10 pare să modifice susceptibilitatea organismului uman la infecţia cu virusul Epstein-Barr, în timp ce mutaţia homozigotă P72R la nivelul proteinei P53 pare a creşte semnificativ (până la 7 ori) riscul dezvoltării cancerelor cervicale la femeile cu infecţii HPV.

E. NOI PERSPECTIVE ÎN DIAGNOSTICUL ŞI TRATAMENTUL CANCERELOR

Descifrarea substratului molecular al unor cancere a permis dezvoltarea unor metode noi de depistare a neoplaziilor maligne, de evaluare a prognosticului şi răspunsului la tratament, precum şi elaborarea primelor metode de terapie specifice, cu rezultate clinice îmbucurătoare.

Printre metodele de depistare precoce se numără dozarea unor *markeri moleculari* cu specificitate de organ. Aşa sunt PSA (antigenul prostatic specific) în cancerul de prostată sau o serie de antigene carbohidrat (CA) precum: CA125 (cancerele ovariene, cervicale şi endometriale), CA27.29 şi CA15-3 (cancerul mamar), CA19-9 (cancerele de colon şi ducte biliare), CA195 (cancerele pancreatice) etc. Identificarea *translocaţiilor cromozomice* care sunt răspunzătoare de producerea hemopatiilor maligne a permis dezvoltarea unor metode de diagnostic şi urmărire a răspunsului la tratament bazate pe dozarea specifică a ARNm himeric. În sfârşit, dozarea nivelului de exprimare a *receptorilor estrogenici şi progesteronici* în cancerele mamare permite predicţia răspunsului la tratamentul hormonal, în timp ce identificarea amplificării ERBB2 (în cancerele mamare) sau MYCN (în neuroblastoame) este asociată cu un prognostic rezervat.

Un exemplu de tratament specific este utilizarea **acidului retinoic** la pacienţii cu leucemie acută promielocitară al cărei substrat molecular este apariţia unei fuziuni între gena pentru receptorul alfa al acidului retinoic şi oncogena PML.

Tratamentul cu **anticorpi monoclonali** a devenit o realitate în cazul bolilor limfoproliferative şi a unui mic număr de alte neoplazii. De exemplu, utilizarea unor anticorpi monoclonali fata de antigenul CD20 exprimat de limfoamele non-Hodgkin derivate din celulele B permite obţinerea unui răspuns clinic lipsit de efecte toxice secundare. La fel, Imatinib mesylate-ul inhibă specific activitatea produsului de fuziune BCR-ABL din leucemia mieloida cronică (vezi caseta 17.2). Un alt exemplu elocvent este cel al anticorpului monoclonal faţă de produsul oncogenei ERBB2 (HER2/neu) amplificată în numeroase cancere de sân. Utilizarea acestui anticorp monoclonal (Transtuzumab - Herceptin) permite obţinerea unui răspuns clinic în forme avansate de cancer. De asemenea, au fost dezvoltaţi o serie de **inhibitori direcţi ai angiogenezei.** Printre aceştia, cel mai cunoscut este anticorpul monoclonal împotriva factorului de creştere vasculară derivat din celulele endoteliale – VEGF (Bevacizumab – Avastin).

In sfârşit, o altă direcţie majora este **terapia genică** (vezi capitolul 19). Mijloacele utilizate sunt extrem de variate dar cercetările în acest domeniu sunt încă într-o etapa incipientă, iar rezultatele clinice inconsistente.

INTERNET

1. American Association for Cancer Research - www. aacr.org;
2. Atlas de genetica si citogenetica in oncologie si hematologie - www.infobiogen.fr/services/chromcancer;
3. Cancer Genome Anatomy Project - www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap;
4. European Organisation for Research and Treatment of Cancer - www.eortc.be;
5. Genecards – bază de date genele umane şi bolile genetice : http://www.bighost.area.ba.cnr.it/GeneCards
6. Informatii despre genetica bolii canceroase - www.cancer-genetics.org;
7. Institute of Cancer Research – www.icr.ac.uk;
8. International Union Against Cancer - www.uicc.org;
9. National Cancer Institute - www.cancer.gov.
10. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/

Bibliografie specifică selectivă

1. Baylin S.B., Esteller M. et al.- *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer* - Hum. Mol. Genet., 2001;10: 687-692;
2. Bianchi N.O., Bianchi M.S., Richard S.M. - *Mitochondrial genome instability in human cancers* - Mutation Research, 2001; 488: 9-23;
3. Carmeliet P., Jain R.K. - *Angiogenesis in cancer and other diseases* - Nature, 2000;407:249-257;
4. Cui H., Cruz-Correa M., Giardiello F.M., Hutcheon D.F., Kafonek D.R., Brandenburg S., Wu Y., He X., Powe N.R., Feinberg A.P. - *Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk* - Science, 2003;299: 1753-1755;
5. Duesberg P., Rasnick D.- *Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own* - Cell Motility and the Cytoskeleton, 2000; 47: 81-107;
6. Eng C., Hampel H., de la Chapelle A.- *Genetic testing for cancer predisposition* - Ann. Rev. Med., 2000; 52: 371-400;
7. Evan G.I., Vousden K.H.- *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer* - Nature, 2001; 411: 342-348;
8. Fodde R., Kuipers J. et al.- *Mutations in the APC tumor suppressor gene cause chromosomal instability* - Nature Cell Biology, 2001; 3: 433-438;
9. Hanahan D., Winberg R.A.- *The hallmarks of cancer* - Cell, 2000; 100: 57-70;
10. Houlston R.S., Tomlinson I.P.M.- *Detecting low penetrance genes in cancer: the way ahead* - J. Med. Genet., 2000; 37: 161-167;
11. Joyce J.A., Schofield P.N.- *Genomic imprinting and cancer* - Molecular Pathology, 1998; 185-190;
12. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.- *Genetic instabilities in human cancers* - Nature, 1998; 396: 643-649;
13. Lynch H.T., de la Chapelle A.- *Hereditary colorectal cancer* - N. Engl. J. Med., 2003; 348: 919-932;
14. Marsh D.J., Zori R.T.- *Genetic insights into familial cancers – update and recent discoveries* - Cancer Lett., 2002; 181: 125-164;
15. Nevins J.R.- *The Rb/E2F pathway and cancer* - Hum. Mol. Genet., 2001;10: 699-703;
16. Patel A.S., Hawkins A.L., Griffin C.A.- *Cytogenetics and cancer* - Curr. Opin. Oncol., 2000; 12: 62-67;
17. Peltomaki P.- *Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer* -

Hum. Mol. Genet., 2001;10: 735-740;
18.Ponder B.A.J.- *Cancer genetics* - Nature, 2001;411: 336-341;
19.Wang J., Hannon G.J., Beach D.H.- *Cell biology: risky immortalization by telomerase* - Nature, 2000; 405: 755-756;
20.Weber G.F., Ashkar S.- *Stress response genes: the genes that make cancer metastasize* - J. Mol. Med., 2000, 78: 663-672;
21.Weinberg R.A.- *Telomeres: Bumps on the road to immortality* - Nature, 1998;396: 23-24;
22.Welcsh P-L, King M.C.- *BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer* - Hum. Mol. Genet., 2001;10: 705-713;
23.Werck-Reichhart D., Feyereisen R.- *Cytochromes P450: a success story* - Genome Biology, 2000, 1: 3003.1-3003.9;
24.Wooster R., Weber B.L. - *Breast and ovarian cancer* - N. Engl.J.Med.,2003;348:2339-2343;

CAPITOLUL 18

PROFILAXIA BOLILOR GENETICE

Profilaxia bolilor genetice include un ansamblu de măsuri ce urmăresc cunoaşterea şi evitarea cauzelor bolilor genetice, depistarea persoanelor şi familiilor cu risc genetic crescut şi diagnosticul precoce al persoanelor afectate.

A. PRINCIPALELE DIRECŢII DE PROFILAXIE A BOLILOR GENETICE

Profilaxia primară a bolilor genetice urmăreşte evitarea apariţiei acestor afecţiuni şi se realizează prin două mari direcţii de acţiune:

(1) Prevenirea apariţiei (producerii) şi/sau transmiterii (propagării) mutaţiilor.

- *Cunoaşterea şi evitarea agenţilor mutageni din mediu* (vezi capitolul 6.B.3) ar putea preveni producerea unor mutaţii. Identificarea agenţilor mutageni este posibilă prin intermediul unor teste de mutageneză şi aceasta permite evitarea lor prin măsuri adecvate de securitate şi educaţie; din păcate un procent important de mutaţii se produc spontan ca urmare a erori de replicare, a dezaminării şi a agresiunilor endogene – ce nu pot fi evitate.
- *Reducerea vârstei reproductive* sub 35-38 de ani la femei şi 45 de ani la bărbaţi ar putea scădea riscul producerii unor gameţi cu anomalii cromosomice (la femei) sau al unor mutaţii genice (la bărbaţi).
- *Transmiterea mutaţiilor* la descendenţi ar putea fi influenţată prin: diagnosticul presimptomatic al purtătorilor de mutaţii dominante (înaintea reproducerii lor), depistarea heterozigoţilor (purtători de mutaţii recesive), evitarea căsătoriilor consanguine (care cresc probabilitatea întâlnirii a doi heterozigoţi) şi acordarea sfatului genetic.

(2) Prevenirea apariţiei bolii la persoanele cu predispoziţie genetică (vezi capitolul 13.A) poate fi realizată prin:

- cunoaşterea factorilor care determină predispoziţia genetică la boală,
- identificarea rudelor sănătoase ale bolnavilor care moştenesc genele de predispoziţie,
- evitarea factorilor de mediu care determină transformarea predispoziţiei genetice în boală.

Profilaxia secundară presupune depistarea precoce a bolii şi/sau evitarea complicaţiilor sale. Acest lucru este posibil prin următoarele acţiuni:

(1) Prevenirea naşterii unui copil cu genotip anormal – în cuplurile cu risc genetic crescut

- *Contracepţia şi/sau fecundarea in vitro*. Atunci când unul din membrii cuplului este afectat se poate evita naşterea unui copil bolnav folosind contracepţia voluntară, temporară (mecanică, hormonală) sau definitivă (ligatura de trompe/canale deferente); o soluţie alternativă este fecundarea in vitro folosind în locul gameţilor persoanei afectate gameţi de la un donator normal.
- *Screeningul şi diagnosticul prenatal.* Screeningul prenatal se realizează de obicei la 16 săptămâni de gestaţie şi mai rar în trimestrul I, la 11 săptămâni – dozând concentraţia unor markeri biochimici în serul matern, care se modifică semnificativ în sarcinile cu fetuşi prezentând defecte de tub neural deschise, sindrom Down sau alte anomalii congenitale. Diagnosticul prenatal se efectuează prin ecografie fetală, analiza (cromosomică sau moleculară) a celulelor fetale (obţinute de obicei printr-o manevră intervenţională: biopsie de vilozităţi coriale, amniocenteză, cordocenteză) sau prin determinări biochimice

în lichidul amniotic; se pot obţine astfel informaţii diagnostice importante, în funcţie de care se va decide sau nu întreruperea sarcinii.

(2) Prevenirea manifestărilor bolilor genetice sau ale complicaţiilor lor la un copil născut cu o boală genetică. Acest obiectiv se realizează prin screening populaţional sau familial care permite depistarea precoce, la naştere sau ulterior în cursul vieţii, a persoanelor cu genotip anormal fără semne clinice de boală sau cu manifestări incipiente.

- *Screeningul neonatal* se adresează unor boli monogenice relativ frecvente în anumite populaţii, care *nu pot fi diagnosticate clinic la naştere*, au consecinţe severe şi sunt costisitor de tratat, dacă se intervine tardiv, după apariţia manifestărilor clinice; ele trebuie să beneficieze de un tratament care, aplicat presimptomatic ar putea să reducă severitatea bolii. În numeroase ţări, screeningul nou-născuţilor vizează fenilcetonuria şi hipotiroidia congenitală.
- *Screeningul heterozigoţilor pentru anumite boli (*de exemplu, talasemie, boala Tay Sachs, fibroza chistică) în anumite grupuri etnice, precum şi screeningul familial al unor persoane cu genotip anormal, permite adoptarea de măsuri profilactice adecvate.

Aplicarea măsurilor de profilaxie, în cadrul unor **Programe naţionale** sau regionale, poate contribui la reducerea poverii bolilor genetice. Ele s-au dovedit a fi eficiente şi în relaţia cost-beneficiu, fiind promovate în toate ţările (inclusiv cele în curs de dezvoltare) care au o politică sanitară coerentă şi ţin cont de recomandările OMS, pentru care bolile genetice sunt o problemă majoră de sănătate publică. Astfel, s-a conturat şi dezvoltat rapid domeniul **geneticii comunitare –** o ramură a geneticii medicale care se ocupă de screeningul şi prevenirea bolilor genetice în populaţie.

B. SCREENINGUL POPULAŢIONAL AL BOLILOR GENETICE

Dezvoltarea cunoştinţelor despre bolile genetice, testele de diagnostic şi posibilităţile lor de tratament au dus la introducerea, în anii ’70, a screeningului populaţional pentru identificarea într-o populaţie definită a unor persoane cu o anumită boală genetică tratabilă, înaintea apariţiei manifestărilor clinice, în stadiul presimptomatic.

Screeningul populaţional a fost definit ca „identificarea prezumtivă a unei boli sau defect nerecunoscut clinic, prin aplicarea unor proceduri ce pot fi realizate rapid, în scopul sortării persoanelor aparent sănătoase care *probabil au* boala de cele care *probabil nu au* boala” (Mausner şi Bahn, 1974). Testele screening *nu sunt menite să asigure diagnosticul definitiv* ci mai curând să identifice un grup populaţional la care vor trebui făcute alte teste diagnostice. **Screeningul genetic** a fost definit (Academia Naţională de Ştiinţe a SUA, 1975) ca fiind „căutarea într-o populaţie a unor persoane cu anumite genotipuri care:

(1) sunt deja asociate cu o anumită boală (de exemplu, screeningul neonatal pentru fenilcetonurie),
(2) pot produce boală la descendenţii lor (de exemplu, detectarea purtătorilor sănătoşi – a heterozigoţilor pentru gena de talasemie sau a fibrozei chistice)”.

În afara celor două categorii, screeningul genetic poate fi aplicat la membrii unei familii în care există o boală genetică sau cu predispoziţie genetică (tabelul 18.1).

Scopul screeningului este recunoaşterea precoce a unei boli sau a unui genotip anormal astfel ca, printr-o intervenţie precoce adecvată, procesele patogenice să poată fi prevenite sau persoanele implicate pot lua o decizie reproductivă informată.

Tabelul 18.1 Tipuri de screening genetic

I. Screening	a) Screening prenatal	- Vârstă maternă >35 de ani - Alfa feto-proteină anormală în serul matern - Triplu test anormal - Ecografia fetală

populaţional	b) Screening neonatal - sânge - urină	 - Fenilcetonurie - Hipotiroidie congenitală; ş.a - Aminoacidopatii
	c) Screeningul heterozigoţilor în anumite grupuri etnice	- Talassemie, sicklemie - Fibroză chistică - Boala Tay-Sachs
II. Screening familial*	- presimptomatic - purtătorii sănătoşi de anomalii cromosomice echilibrate - heterozigoţii în boli recesive: autosomale legate de X - premutaţii	- Boala Huntington, cancer sân, cancer colon, ş.a - Translocaţii - Fibroză chistică - Distrofie musculară Duchenne - Sindromul X fragil, ş.a.

* Pe bază de Registre genetice

Iniţial screeningul genetic era numai *neonatal* şi viza fenilcetonuria – o afecţiune în care, după depistarea sa la noi născuţi, o dietă cu conţinut redus de fenilalalnină putea preveni retardul mental produs de boală; ulterior, screeningul neonatal s-a extins la hipotiroidia congenitală şi apoi la alte erori înnăscute de metabolism.

Aproape concomitent s-a introdus *screeningul prenatal* pentru defectele de tub neural (DTN) deschise – prin dozarea alfa fetoproteinei (AFP) în lichidul amiotic şi apoi în serul matern; acţiunea a fost foarte eficientă deoarece, în trei decenii, prevalenţa DTN a scăzut semnificativ (de circa 30 de ori în Marea Britanie). Determinarea AFP şi a altor markeri serici materni a permis de asemenea identificarea sarcinilor cu sindrom Down sau cu alte aneuploidii autosomale. Screeningul seric matern şi ecografia fetală permit depistarea a circa ¾ din fetuşii cu sindrom Down şi peste 80% din sarcinile cu DTN. În multe ţări, screeningul prenatal a devenit o parte importantă a îngrijirii prenatale de rutină,

Screeningul populaţional s-a dezvoltat ulterior prin introducerea depistării, în populaţia adultă, a *purtătorilor sănătoşi* ai unei mutaţii pentru una dintre bolile genetice frecvente în populaţia respectivă (talassemie, sicklemie, fibroză chistică, cancere ereditare etc); acest lucru este util pentru sfatul genetic acordat cuplurilor de heterozigoţi, al căror risc de a avea un descendent afectat este de 25%. În acest context, o altă acţiune profilactică eficace o reprezintă **registrele genetice,** realizate în Centrele de Genetică Medicală, ce conţin informaţii despre bolnavii cu anumite afecţiuni precum şi despre rudele lor sănătoase, cu risc genetic crescut; ele reprezintă o premiză valoroasă pentru iniţierea unor acţiuni de diagnostic precoce, prenatal sau presimptomatic postnatal.

În era medicinii genomice se va dezvolta medicina predictivă pe baza screeningului populaţional care va determina *susceptibilitatea individuală* la bolile comune ale adultului, cum ar fi boala coronariană, diabetul zaharat sau cancerul; va deveni, astfel, posibilă identificarea unor persoane sau grupe de risc la care se vor iniţia acţiuni de prevenţie primară (de exemplu, dieta, exerciţiile ş.a) sau secundară (detectarea precoce sau intervenţiile farmacologice) pentru a preveni boala sau îmbunătăţi starea de sănătate.

În ultimii ani s-au înregistrat progrese însemnate în screeningul populaţional prin folosirea unor noi tipuri de teste şi de instrumente: spectrofotometrie, fluorometrie, determinările imunoreactive, spectrometria de masă, genetica moleculară.

1. PRINCIPII DE SCREENING POPULAŢIONAL

1.1 CRITERIILE DE SCREENING

Orice program de screening populaţional trebuie să îndeplinească o serie de criterii care ţin de boală, test şi program.

- *Boala* trebuie să fie relativ frecventă în populaţia ţintă şi să aibă efecte potenţiale severe asupra stării de sănătate, care să poată fi prevenite sau ameliorate, printr-o intervenţie medicală precoce; acest lucru va asigura beneficiul necesar, în măsură să justifice costul programului de screening.

- *Testele* trebuie să fie non-invazive, uşor de realizat (eventual prin automatizare) şi ieftine; ele trebuie să aibă o acurateţe ridicată. *Acurateţea* se referă la capacitatea testului de a separa indivizii care au boala de cei care nu o au; ea implică două componente: sensibilitatea şi specificitatea (determinate prin compararea rezultatelor screeningului cu acelea ale testelor definitive de diagnostic; tabelul 18.2):
  - *sensibilitatea* este abilitatea testului de a identifica corect indivizii care *au boala*; ea se măsoară prin proporţia indivizilor afectaţi la care testul este pozitiv („adevăraţi pozitivi"); se poate exprima şi prin proporţia rezultatelor *fals-negative*, adică a cazurilor neidentificate;
  - *specificitatea* este capacitatea testului de a identifica corect subiecţii care nu sunt afectaţi; ea se măsoară prin proporţia indivizilor neafectaţi la care testul este negativ („adevăraţi negativi); se poate exprima şi prin proporţia rezultatelor *fals-pozitive,* (1-specificitatea) adică a cazurilor neafectate incorect depistate;

  Testele de screening sunt – într-un număr foarte redus – 100% sensibile şi 100% specifice deoarece distribuţia valorilor testului în populaţia bolnavilor se suprapune parţial pe cea observată în populaţia neafectată; astfel, un test screening – spre deosebire de un test diagnostic – va identifica incorect unii indivizi din populaţia testată; de aceea se stabileşte o valoare prag care separă indivizii afectaţi din populaţie de cei neafectaţi. Acurateţea testelor pozitive – ori *valoarea predictivă pozitivă* sau proporţia testelor pozitive care sunt cu adevărat pozitive – se măsoară prin proporţia indivizilor cu test pozitiv care au într-adevăr boala [se calculează prin raportul a/(a+b) din tabelul 18.2]

Tabelul 18.2 Calculul sensibilităţii şi specificităţii

	Starea de boală	
Test Screening	Bolnavi	Sănătoşi
Rezultate pozitive (+)	**a** (adevărat pozitiv)	**b** (fals pozitiv)
Rezultate negative (-)	**c** (fals negativ)	**d** (adevărat negativ)
Sensibilitate = a/(a+c)		
Specificitate = d/(b+d)		
Valoare predictivă pozitivă = a/a+b)		

- *Programul* trebuie oferit în mod corect şi *echitabil,* unui număr cât mai mare de persoane; participarea trebuie să fie *voluntară*, bazată pe o informare completă şi uşor de înţeles, care să permită un *consimţământ informat*. Foarte important este ca programul să asigure resursele necesare pentru diagnosticul şi tratamentul persoanelor depistate prin screening. Costul programului de screening trebuie să fie rezonabil şi permisibil iar relaţia cost-beneficiu – corectă. Decizia introducerii unui program de screening se bazează pe factori etici, medicali, financiari şi politici.

  Costurile „măsurabile" includ cheltuielile necesare desfăşurării programului de screening şi costurile îngrijirii/tratamentului pacientilor identificaţi în stadiul presimptomatic[1]. Beneficiile, deseori dificil de evaluat, sunt reprezentate de îmbunătăţirea calităţii vieţii pentru pacient şi familie plus reducerea costurilor îngrijirii pacienţilor depistaţi clinic tardiv.

1.2. TIPURI DE SCREENING POPULAŢIONAL.

În funcţie de populaţia ţintă şi de obiective se pot deosebi mai multe categorii *operaţionale* de screening populaţional (tabelul 18.1).

- *Screeningul prenatal* – urmăreşte identificarea gravidelor cu risc suficient de mare pentru a justifica aplicarea unor proceduri de diagnostic invaziv care, datorită riscului medical şi

[1] Dacă nu sunt disponibile fondurile necesare tratamentului presimptomatic al unei boli atunci nu are rost introducerea unui program de screening pentru acea boală.

costului ridicat, nu pot fi aplicate la toate gravidele. Se realizează prin dozarea unor markeri biochimici fetali în serul matern şi ecografie fetală pentru a depista fetuşii cu defecte deschise de tub neural (şi eventual alte malformaţii congenitale) precum şi cei cu sindrom Down (şi alte aneuploidii).

- *Screeningul neonatal* – se adresează unor boli monogenice relativ frecvente (fenilcetonuria, hipotiroidia congenitală ş.a) care nu pot fi diagnosticate *clinic* la naştere, au consecinţe severe şi sunt costisitor de tratat, dacă se intervine tardiv, după apariţia manifestărilor clinice. Ele trebuie să beneficieze de un tratament care să reducă atât severitatea bolii (dacă este început presimptomatic) cât şi costurile îngrijirii pacientului (comparativ cu tratamentul început postsimptomatic).
- *Screeningul purtătorilor sănătoşi* ai unei mutaţii pentru o anumită boală monogenică frecventă într-o anumită populaţie (talasemie, sicklemie, fibroză chistică, etc)[2] identifică familiile cu risc genetic crescut.

1.3. SERVICIILE DE SCREENING.

Realizarea screeningului nu este o problemă tehnică ci mai ales una *profesională şi managerială*. Într-adevăr, screeningul se impune a fi realizat de un serviciu integrat, de înaltă calitate (acreditat), care trebuie să asigure patru elemente: management, monitorizare, informare şi decizie, pregătire profesională continuă.

- *Managementul serviciului* trebuie să fie asigurat de către un medic consultant, cu experienţă în screening, care va avea toate responsabilităţile serviciului; el va fi ajutat de către un *coordonator de screening* – responsabil de activitatea zilnică. Cei doi coordonatori trebuie să lucreze într-o strânsă colaborare şi să ajusteze programul de screening şi metodele de furnizare a serviciilor în funcţie de resurse şi necesităţi. Pentru introducerea şi desfăşurarea testării sunt esenţiale *colectarea probelor, infrastructura de laborator şi profesionalismul echipei***.**
- *Monitorizarea programului* include evaluarea periodică a performanţelor testelor, a metodelor de laborator şi furnizarea serviciilor – prin acţiuni de control de calitate, intern şi extern; în funcţie de datele obţinute se va realiza o ameliorare continuă a programului de screening.
- *Informare şi decizie*. Persoanele ce ar putea beneficia de screening trebuie să fie informate adecvat (oral şi în scris), înainte de efectuarea testului, despre metodele de screening, avantajele şi limitele lor (posibilitatea unor rezultate fals negative sau fals pozitive), pentru a lua o *decizie personală informată privind participarea la test*. După efectuare, rezultatele pozitive trebuie transmise imediat, de către o persoană care să cunoască bine problemele legate de screening şi să le explice într-o manieră tonică, relaxantă şi plină de înţelegere. Rezultatele negative se pot comunica prin telefon cu menţiunea că nu exclud complet ca subiectul să fie afectat. Esenţial este ca subiecţii să înţeleagă faptul că metodele de screening *nu realizează un diagnostic cert* ci numai o apreciere a riscului.
- *Pregătirea continuă a staff-ului (training)* este importantă, pentru a asigura calitatea tuturor etapelor/ operaţiunilor (începând de la completarea formelor de solicitare a testului – cu date clinice relevante pentru interpretare, metoda de lucru şi terminând cu transmiterea rezultatelor). Periodic se vor face informări privind controlul de calitate şi performanţele programului în care echipa tehnică este implicată.

1.4. PROBLEME ETICE ASOCIATE SCREENINGULUI POPULAŢIONAL

Toate tipurile de screening – prenatal, neonatal, al purtătorilor adulţi – ridică multiple şi delicate probleme etice; deşi ele vor fi discutate în detalii în capitolul 20 vom preciza aici

[2] La această categorie se poate ataşa *diagnosticul presimptomatic* al purtătorilor sănătoşi de mutaţii patogene prezenţi în familia unui bolnav, pe baza unor *registre genetice.*

câteva aspecte. Problema esenţială este posibilitatea compromiterii *autonomiei de decizie a* cuplului (în cazul screeningului prenatal) sau a părinţilor (în cazul screeningului neonatal), determinată de *o informare inadecvată* premegătoare testării. La aceasta se poate adăuga o *inechitate în accesul la programele de screening* (în special prenatal) datorită fie limitării resurselor sau distribuţiei lor inegale (fapt ce împiedică efectuarea screeningului întregii populaţii ţintă), fie unei adresabilităţi inegale, determinată de o informare şi educaţie sanitară deficitare (a populaţiei dar şi a medicilor de familie) sau de dificultăţile financiare ale familiei.

- În *screeningul seric matern prenatal* cuplurile pot *să nu înţeleagă* semnificaţia proporţiilor de rezultate fals pozitive (5%) sau fals negative (10-20%) şi astfel pot fi confruntate cu opţiunile diagnosticului prenatal pe care ele nu le-au luat în considerare; la aceasta se pot adăuga complexitatea interpretării testelor şi dificultăţile în înţelegerea informaţiilor post-testare. Mai există şi o problemă de *costuri* care cresc (cu circa 25%) o dată cu numărul mai mare de amniocenteze necesare pentru validarea testelor serice materne.
- În *screeningul neonatal,* pentru a reduce rata nedepistării unor cazuri de boală, este necesar un nivel înalt de participare la screening; în unele ţări/regiuni participarea la screening este obligatorie, dar cele mai multe programe se bazează pe *includerea voluntară* a mamelor în testare. Deseori se alege varianta „*opt-out*": gravidele sunt informate prenatal despre test şi dacă nu-şi exprimă dezacordul sunt incluse automat în testare, fără a li se mai cere alt consimţământ. Desigur, din punct de vedere etic, varianta „*opt-in*" este cea mai corectă deoarece se solicită un consimţământ informat, activ, înainte de efectuarea testului.
- *Screeningul purtătorilor sănătoşi* se confruntă cu problema *confidenţialităţii* datelor, mai ales faţă de angajatori sau companiile de asigurări

Vom sublinia, din nou, că programele de screening ar trebui să fie oferite în mod echitabil întregii populaţii, participarea ar trebui să fie *voluntară*, bazată pe o informare completă şi uşor de înţeles, care să permită un *consimţământ informat*; persoanele vizate *au dreptul de a alege să nu fie testate*.

2. SCREENINGUL PRENATAL

Screeningul prenatal se efectuează prin determinarea concentraţiei unor markeri biochimici fetali[3] în serul matern, care se modifică semnificativ în sarcinile în care fetusul are defecte de tub neural (DTN) deschise, sindrom Down sau alte anomalii congenitale.

2.1 SCREENINGUL PRENATAL AL DTN DESCHISE

Iniţial screeningul serului matern a vizat DTN[4] prin determinarea **alfa fetoproteinei** (AFP), la 16 săptămâni de vârstă gestaţională (VG)[5], care are valori semnificativ mai mari la gravidele cu fetuşi ce au DTN deschise.

- AFP este echivalentul fetal al albuminei şi principala proteină din sânge în primele stadii ale dezvoltării fetale; treptat, spre sfârşitul perioadei fetale şi neonatal, AFP este înlocuită cu albumina. AFP difuzează prin membranele fetale în sângele matern; în mod normal, concentraţia AFP în serul matern (AFM-SM) creşte treptat, din săptămâna a 10-a până în săptămâna a 32-a de gestaţie.
- Valorile AFP pentru o anumită gravidă sunt exprimate ca *multiplu al medianei („multiple of median – MoM")* pentru sarcinile normale de aceeaşi vârstă gestaţională; *mediana* – este valoarea mijlocie a rezultatelor determinărilor AFP efectuate într-o anumită săptămână de vârstă gestaţională (într-o populaţie

[3] Este vorba de proteine produse de făt în cursul perioadei gestaţionale sau hormoni produşi de unitatea feto-placentară.

[4] DTN îndeplinesc condiţiile unei boli supuse screeningului deoarece sunt anomalii congenitale relativ frecvente, au consecinţe grave pentru făt şi 95% dintre copiii cu DTN se nasc din gravide fără istoric familial pozitiv.

[5] VG se determină în raport cu data primei zile a ultimei menstruaţii sau, mai bine, prin estimarea diametrului biparietal (DBP) prin ecografie (dacă ritmul creşterii fetale este normal).

definită de gravide), aranjate în ordine crescătoare[6]; un *multiplu al medianei* se obţine prin divizarea valorii observate la o gravidă cu o anumită vârsta gestaţională la valoarea mediană stabilită pentru VG respectivă. De obicei se face o *corecţie* a nivelului AFP în raport cu greutatea gravidei (nivelul AFP-SM scade o dată cu creşterea greutăţii materne, datorită diluţiei AFP în circulaţia maternă)[7], etnia, prezenţa diabetului, fumatul şi alţi factori.

- Orice defect fetal, care permite *scurgerea* serului fetal în lichidul amniotic (LA), va produce creşterea semnificativă a AFP în LA şi apoi în serul matern[8]. Principala cauză a acestui fenomen este reprezentată de către defectele deschise ale tubului neural[9] (ţesutul neural este expus direct la exterior sau acoperit de o membrană subţire şi transparentă).
- Curbele nivelului AFP-SM ăn sarcinile normale şi anormale se suprapun parţial (figura 18.1), de aceea în practică a fost introdus *un nivel prag arbitrar* – corespunzător percentilului 95 sau multiplului 2,5 al medianei – peste care se poate afirma existenţa unui DTN.

Screeningul AFP-SM se practică de obicei la 16 săptămâni de vârstă gestaţională (determinată ecografic prin DBP), deşi performanţele sunt mai mici decât la 17 săptămâni, pentru a permite eventuala întrerupere a sarcinii până la 20 săptămâni. Circa 1-2% din femeile gravide vor prezenta valori crescute ale AFP-SM peste pragul AFP $\geq$ 2,5 MoM şi vor fi supuse *testelor diagnostice*: ecografie şi amniocenteză, pentru a se determina nivelul AFP şi acetilcolinesterazei în LA.

- **Ecografia fetală** dă rezultate foarte bune dacă este practicată de specialişti cu experienţă; anencefalia este practic totdeauna observată; spina bifida se poate identifica combinând examinarea coloanei vertebrale cu semnele craniene: reducerea DBP, semnul „*lămâiei*" (regiunea frontală a craniului fetal este mai „ascuţită" luând formă de lămâie în locul formei normale de ou") şi semnul "*bananei*" (diametrul transvers al cerebelului este redus). În centrele unde ecografia se efectuează de rutină examenul ultrasonografic ar putea înlocui dozarea AFP-SM pentru screeningul DTN dar screeningul AFP-SM este mai uşor de aplicat la un număr mare de gravide, nu necesită operatori antrenaţi în ecografie şi, în plus, dă informaţii şi pentru screeningul sindromului Down (vezi mai jos).
- Amniocenteza şi dozarea AFP în LA contribuie la confirmarea diagnosticului la valori de 3,5 MoM, la 16 săptămâni VG; dacă se găsesc valori $\geq$ 2 MoM (5% dintre gravide) atunci se practică şi dozarea **acetilcolinesterazei** în LA, detectându-se astfel 99% din toate DTN deschise cu o rată de 0,3% rezultate fals-pozitive (determinate în special de contaminarea cu sînge a LA)

Numai 1 din 15 femei cu AFM-SM crescută va avea AFM crescută şi în LA. Deci *valoarea predictivă a AFM-SM* este scăzută – de circa 6% . Totuşi *sensibilitatea* AFM-SM[10] este înaltă, permiţând identificarea a peste 90% din fetuşii cu anencefalie şi a peste 80% din cazurile de spina bifida deschisă. Dozarea AFM-SM combinată cu ecografia identifică peste 95% din DTN. Screeningul DTN prin determinarea AFP-SM nu are nici o *specificitate* de 100% deoarece există şi alte cauze ce produc creşterea AFP-SM: supraestimarea vârstei gestaţionale (!), sarcini multiple, făt mort, iminenţe de avort tratate, alte anomalii fetale: defecte ale peretelui abdominal (omfalocel, gastroschizis), atrezii esofagiene şi intestinale, teratoame sacro-coccigiene, extrofie vezicală, sindrom nefrotic congenital, leziuni cutanate şi sângerări fetale intrauterine. Cea mai mare parte dintre aceste situaţii pot fi însă diferenţiate de DTN prin ecografie. În ciuda acestor limite determinarea AFM-SM este larg utilizată şi, împreună cu suplimentarea periconcepţională cu acid folic (vezi capitolul 13.B.1) a dus la scăderea semnificativă a incidenţei DTN în multe ţări.

2.2 SCREENINGUL PRENATAL AL SINDROMULUI DOWN

Iniţial, screeningul prenatal al sindromului Down (SD) s-a bazat pe asocierea recunoscută dintre vârsta maternă avansată şi boală (Penrose, 1933) şi consta din analiza cromosomilor în celulele fetale (Valenti et al, 1968) la gravidele de peste 35 de ani. Dar

[6] *Mediana* este o valoare mai bună decât *media* – deoarece nu este influenţată de valori ocazionale.
[7] Corecţia se face prin divizarea valorilor MoM observate prin valorile MoM aşteptate la o anumită greutate maternă.
[8] Iniţial screeningul DTN deschise s-a făcut prin determinarea radioimunologică a AFP în LA; deoarece nivelul AFM-LA se corelează cu nivelul AFP-SM s-a introdus screeningul serului matern şi măsurarea AFP printr-o manevră neinvazivă.
[9] DTN închise, acoperite de piele sau o membrană groasă şi opacă, nu pot fi detectate prin dozarea AFP.
[10] Deşi sensibilitatea AFM-SM este mai mică decât a AFM-LA riscurile determinărilor AFM-SM sunt nule.

numai circa 5-7% dintre femeile gravide se încadrează în această categorie şi numai 25-30% dintre toate cazurile de SD se nasc din mame de peste 35 de ani. Ulterior s-a descoperit că sarcinile cu fetuşi care au SD se asociază cu *reducerea AFM-SM* (Mercatz et al., 1984), *creşterea concentraţiei serice a gonadotropinei corionice umane (HCG)* (Bogart et al, 1987) şi *scăderea estriolului neconjugat (uE3)* în serul matern (Wald et al, 1988)[11]; aceşti trei markeri serici au fost asociaţi în **triplul test** care, depistând circa 60-70% dintre sarcinile afectate, a fost introdus după 1990 în practica de rutină a îngrijirii prenatale în multe ţări ale lumii.

a) Screeningul seric la 16 săptămâni de sarcină.

În mod normal, în trimestrul II de sarcină nivelul seric matern al AFP şi uE3 creşte o dată cu vârsta gestaţională iar cel al HCG total scade; în SD aceşti markeri, exprimaţi ca multiplu al medianei (MoM) – vezi mai sus – se modifică semnificativ: AFM şi uE3 scad cu aproximativ 25% iar valoarea HCG se dublează[12] (figura 18.2). Nici unul dintre cei trei markeri serici nu dă, evident, o discriminare absolută dar luaţi împreună, în triplul test, ei pot modifica riscul iniţial al unei sarcini cu SD dat de vârsta maternă; când pragul de risc este ≥ 1:270 testul screening este pozitiv (la circa 5% din toate gravidele) şi se propune efectuarea amniocentezei de diagnostic: se identifică astfel circa 67% din cazurile de sindrom Down dar testul este fals pozitiv la 5% din gravide care vor avea un făt normal (figura 18.3). Valorile situate în limitele normale reduc probabilitatea ca fetusul să fie trisomic, fără însă a o exclude.

Performanţele triplului test în SD pot fi sporite până la 70%-80% dacă se măsoară şi fosfataza alcalină rezistentă la uree a neutrofilelor (triplul test plus) sau subunităţile libere α şi β ale HCG. Recent a fost identificat un al patrulea marker seric – *inhibina A* – care la 16 săptămâni de sarcină are un nivel de 1,8 MoM în sarcinile cu SD; astfel **quadruplul test** (AFP, uE3, HCG şi inhibina A sau βHCG) identifică la această vârstă gestaţională circa 79% din fetuşii cu SD cu o rată de 5% rezultate fals-pozitive.

Triplul test – efectuat la 16 săptămâni de sarcină – furnizează informaţii utile nu numai pentru evaluarea riscului naşterii unui copil trisomic, ci şi pentru depistarea altor anomalii fetale (vezi tabelul 18.3).

Tabelul 18.3. Variaţiile markerilor serici materni în diferite afecţiuni fetale.

Afecţiunea fetală	Nivelul markerilor serici materni		
	AFP	estriol neconjugat	HCG
moartea fetusului, spina bifida deschisă, defecte ale peretului abdominal	crescut	normal	normal
anencefalie	crescut	redus	normal
hiperplazie corticosuprarenaliană congenitală	normal	foarte redus	normal
sindromul Down, sindromul Turner cu higroma chistică	redus	redus	crescut
trisomia 18	redus	redus	redus
monosomia X fără higroma	normal	redus	redus

Intervalul optim pentru efectuarea triplului test este cuprins între săptămânile 15 şi 18 de sarcină, cel mai bine la 16 săptămâni. Nivelurile serice ale markerilor utilizaţi în evaluarea riscului naşterii unui copil afectat sunt influenţate de mai mulţi factori:

- vârsta gestaţională (care trebuie stabilită cu exactitate prin examen ecografic);
- greutatea gravidei;
- diabetul insulino-dependent matern;
- sarcina multifetală;

[11] HGC este un hormon glicoproteic alcătuit din două subunităţi neidentice – alfa şi beta – aflate fie libere, fie cuplate între ele; HGC este produsă de sinciţiotrofoblastul placentar şi excretată direct în sângele matern. Estriolul neconjugat este un hormon steroid secretat de unitatea fetoplacentară.

[12] Valorile medii ale celor trei markeri în sarcinile cu SD, exprimate ca multipli ai MoM din sarcinile normale (la care prin definiţie MoM este 1,0) sunt: AFP – 0,75; uE3 – 0,73; HCG – 2,05 (după Muller şi Young, 1999); ca şi în cazul DTN se vor face o serie de corecţii ale valorilor observate funcţie de VG, greutate maternă, imaturitate fetală, fumat etc.

- istoricul familial de trisomii sau defecte de tub neural;
- numărul de ţigări fumate zilnic;
- grupul etnic căruia îi aparţine gravida.

Prelucrarea computerizată a valorilor biochimice raportate la factorii menţionaţi stabileşte magnitudinea riscului. În sindromul Down, de pildă, limita acceptată (*cut off*) este de 1/270 (corespunzătoare riscului de trisomie 21 al gravidelor de 35 de ani, dar inferioară riscului de avort consecutiv amniocentezei).

Tinând cont de performanţele şi mai ales de limitele screeningului serului matern, părinţilor trebuie să li se explice foarte clar că *triplul test este numai un test de screening* si nu unul de diagnostic. Gravidele la care rezultatele triplului test sunt pozitive trebuie supuse unui examen ecografic efectuat cu aparatură de înaltă rezoluţie, de către experţi în medicina fetală. Se impune a fi subliniat faptul că rezultatele celor două tipuri de investigaţii – biochimice şi ecografice – au doar o valoare orientativă. Diagnosticul prenatal de certitudine se stabileşte exclusiv prin examinarea citogenetică a celulelor fetale obţinute prin metode invazive

b) Screeningul sindromului Down la 10 săptămâni de sarcină.

Testele de screening şi diagnostic prenatal a SD efectuate în trimestrul al doilea de sarcină au dezavantajele traumei psihologice şi ale dificultăţilor obstetricale de întrerupere a cursului sarcinii. Ambele inconveniente pot fi depăşite prin introducerea unor teste de screening al SD în trimestrul I.

Rezultatele unor cercetări recente atestă că examenele biochimice, în special cele care evidenţiază scăderea concentraţiei *proteinei plasmatice A asociată cu sarcina (PAPP-A)* şi creşterea nivelului seric al subunităţii beta libere a HGC[13], sunt capabile să detecteze, încă din săptămânile 8-9 de sarcină, circa 60% din sarcinile cu fetuşi având trisomie 21 (la un nivel de risc de 1:300). Performanţele screeningului la 10 săptămâni de sarcină sunt aproape similare cu cele obţinute cu triplul test la 16 săptămâni dar inferioare quadruplului test. Rezultatele pot fi însă substanţial ameliorate prin cercetarea unui marker ecografic: translucenţa nucală ≥ 3 mm.

Detecţia precoce are însă şi dezavantaje. Acestea includ:

- obligativitatea stabilirii ecografice a vârstei gestaţionale;
- riscurile crescute ale biopsiei de vilozităţi coriale efectuată în primul trimestru pentru confirmarea citogenetică a diagnosticului;
- sensibilitatea mai redusă a testelor;
- imposibilitatea obţinerii unor date suplimentare (de exemplu detectarea DTN) prin dozarea AFP, care nu are valori semnificativ modificate în trimestrul I de sarcină;
- costurile mai ridicate în cazul în care rezultatele sunt incerte şi investigaţiile urmează a fi repetate în al doilea trimestru;
- screeningul precoce se dovedeşte a fi inutil în cel puţin 20% din cazuri, această cifră reprezentând proporţia fetuşilor afectaţi care sunt avortaţi spontan între săptămânile 10 şi 16 de sarcină.

Cu toate acestea screeningul biochimic şi ecografic al SD în primul trimestru de sarcină cunoaşte o permanentă dezvoltare.

3. SCREENINGUL NEONATAL

Programele de screening ale nou-născuţilor reprezintă o oportunitate ideală pentru depistarea presimptomatică şi prevenirea unor boli genetice. Prima afecţiune supusă screeningului neonatal a fost fenilcetonuria, o boală relativ frecventă care evoluează natural spre un retard mental profund; această evoluţie poate fi evitată dacă boala este depistată – prin evaluarea fenilaninei în sânge (mai exact, o picătură de sânge colectată de la sugar pe o hârtie de filtru şi apoi uscată) cu ajutorul testului de inhibiţie bacteriană descris de Guthrie – şi

[13] Valoarea mediană a PAPP-A în sarcinile cu SD este în jur de 0,43 MoM iar a β-HCG de 1,79 MoM (Wald et al 1997.

tratată imediat după naştere, când sugarul este încă asimptomatic, printr-o dietă săracă în fenilalanină. Demonstrarea succesului testului şi a eficienţei tratamentului au dus la introducerea, în multe ţări ale lumii, a screeningului neonatal pentru unele boli genetice ca o modalitate utilă de optimizare a sănătăţii publice.

Aşa cum am precizat, screeningul neonatal se adresează unor boli monogenice relativ frecvente în anumite populaţii sau grupuri etnice, care *nu pot fi diagnosticate clinic la naştere,* au consecinţe severe şi sunt costisitor de tratat, dacă se intervine tardiv, după apariţia manifestărilor clinice. Ele trebuie să beneficieze de un tratament care să reducă atât severitatea bolii (dacă este început într-un stadiu presimptomatic) cât şi costurile îngrijirii pacientului (comparativ cu tratamentul început postsimptomatic). Aceste condiţii sunt îndeplinite integral de *fenilcetonurie şi de hipotiroidia congenitală* şi parţial de *galactozemie şi hiperplazia suprarenaliană congenitală* sau de unele aminoacidemii. În prezent, în unele regiuni (centre) sau ţări s-a introdus în programele de screening neonatal şi depistarea unor afecţiuni genetice frecvente – cum ar fi fibroza chistică, hemoglobinopatiile, distrofia musculară Duchenne (la băieţi), deficienţa în α-1-antitripsină – pentru care nu există încă un tratament eficace dar care diagnosticate precoce pot fi ameliorate prin tratamente paliative sau permit un sfat genetic corect, un planing familial şi un diagnostic prenatal la sarcinile următoare[14].

În ultimii ani s-au înregistrat progrese importante în screeningul neonatal prin standardizarea procedurilor de colectare şi procesare a picăturilor de sânge, introducerea unor noi tipuri de teste şi aparate, de obicei automatizate, ce îmbunătăţesc sensibilitatea şi specificitatea. Pentru a reduce numărul rezultatelor fals pozitive se foloseşte deja testarea în două etape: în prima etapă se utilizează teste cu sensibilitate şi precizie mai mică iar în a doua etapă, folosind proba iniţială, teste de mare precizie; de exemplu în screeningul fenilcetonuriei testul Guthrie urmat de determinarea tirozinemiei.

3.1. SCREENINGUL NEONATAL PENTRU FENILCETONURIE

Screeningul nou-născuţilor pentru fenilcetonurie (PKU) reprezintă primul şi cel mai bun exemplu pentru a demonstra eficienţa screeningului neonatal în bolile genetice. PKU este o boală autosomal recesivă, relativ frecventă (1:13.000 naşteri), produsă de o deficienţă a fenilalanin hidroxilazei, prima enzimă ce intervine în calea metabolică principală a fenilalaninei; aceasta duce la creşterea concentraţiei plasmatice a fenilalaninei şi metaboliţilor săi, cum ar fi fenilpiruvatul („fenilcetona") şi la scăderea tirozinei. Boala nu poate fi identificată clinic în primul an de viaţă si netratată evoluează în peste 95% din cazuri spre un retard mental profund care poate fi prevenit prin menţinerea fenilalaninei plasmatice la un nivel aproape normal cu o dietă săracă în fenilalanină, începută în primele săptămâni de viaţă[15]. Există controverse asupra duratei de menţinere a dietei dar este cert faptul că gravidele cu PKU trebuie să fie supuse unui control strict pentru a fi evitate efectele negative ale hiperfenilalaninemiei asupra fetusului.

PKU este detectată la nou-născuţi prin măsurarea fenilalaninei în sânge folosind testul Guthrie de inhibiţie bacteriană. Cîteva picături de sânge, recoltate de regulă din călcâi la 2-3 zile după naştere, sunt plasate pe o hârtie de filtru specială; un eşantion din picătura de sânge uscat este plasat pe o placă cu agar şi incubat cu o linie de *Bacillus subtillis* care necesită fenilalanină pentru creştere. Măsurarea creşterii bacteriene permite determinarea cantităţii de fenilalanină în proba de sânge; testele pozitive sunt de obicei repetate şi urmate de dozarea

[14] S-a demonstrat că în DM Duchenne (circa 1:4500 nou-născuţi de sex masculin) prin screening pot fi prevenite prin screening peste 15% din sarcinile cu fetuşi afectaţi, fapt ce conferă programului un raport cost-beneficiu favorabil.

[15] O excepţie importantă este reprezentată de pacienţii care au un defect în metabolismul *biopterinei,* care vor urma un tratament diferit.

cantitativă a fenilalaninei (>20 mg/dl în PKU clasică) şi tirozinei în plasmă. Sensibilitatea testului[16] este de circa 95% şi specificitatea aproape de 100%.

Analizele cost-beneficiu în screeningul PKU sunt foarte favorabile justificând (singur) cheltuielile pentru infrastructura necesară colectării şi testării neonatale (în Marea Britanie beneficiul net pentru fiecare pacient identificat şi tratat a fost de 143.000 £).

3.2. SCREENINGUL NEONATAL PENTRU HIPOTIROIDISMUL CONGENITAL

Hipotiroidismul congenital (CH) este o boală frecventă (circa 1:4000 de naşteri) – produsă de obicei de *agenezia tiroidiană* non-genetică (aport insuficient de iod) şi, mai rar, de hipopituitarism sau de defecte genetice în sinteza tiroxinei, şi care, netratată la timp, evoluează spre retard mental, hipostatură şi facies grosier.

Screeningul neonatal al CH se realizează, în prezent, prin măsurarea TSH în probe de sânge recoltate a treia zi de viaţă. Tratamentul cu tiroxină (în doză suficientă pentru a menţine TSH plasmatic la valori normale) previne dezvoltarea simptomelor severe dar nu exclude total unele deficite neurologice ce pot apărea mai târziu în viaţă.

Eficienţa screeningului neonatal este influenţată de CH tranzitoriu la un sugar ce va deveni eutiroidian în câteva luni şi mai ales de cazurile în care boala se dezvoltă mai târziu la nou-născuţi cu rezultate normale la screening. Totuşi, analizele cost-beneficiu ale screeningului neonatal al CH sunt foarte favorabile determinând introducerea sa în toate programele de screening neonatal.

4. SCREENINGUL POPULAŢIONAL AL HETEROZIGOŢILOR

Screeningul heterozigoţilor (Na) constă în testarea unei populaţii ţintă pentru identificarea purtătorilor sănătoşi a unei gene-boală, cu risc crescut de a avea copii afectaţi de o boală recesivă gravă; purtătorii depistaţi vor primi apoi informaţii adecvate şi complete despre riscurile şi opţiunile reproductive posibile (inclusiv diagnosticul prenatal).

Criteriile tehnice şi etice pe care trebuie să le îndeplinească programele de screening a purtătorilor sunt următoarele:

- frecvenţa mare a heterozigoţilor în populaţia-ţintă – de obicei grupuri etnice specifice – (tabelul 18.4) pentru a justifica screeningul;
- existenţa unui test ieftin şi precis, cu foarte puţine rezultate fals-negative şi fals-pozitive;
- cuplurile de heterozigoţi identificate trebuie să aibe acces la sfat genetic şi diagnostic prenatal;
- participarea la screening trebuie să fie voluntară, bazată pe un consimţământ informat şi accesibilă tuturor membrilor comunităţii, iar rezultatele strict confidenţiale.

Tabelul 18.4.Exemple de programe de screening ale heterozigoţilor
(modificat după Jorde et al, 1999)

Boală	Grup etnic	Frecvenţa heterozigoţilor	Frecvenţa cuplurilor cu risc
Boala Tay-Sachs	Evrei Ashkenazi	1/30	1/900
β-Talasemia	Ciprioţi, greci, italieni	1/30	1/900
α-Talasemia	Asiatici (sud-est), chinezi	1/25	1/625
Sicklemia	Afro-americani	1/12	1/150
Fibroza chistică	Europeni (nord-vest)	1/25	1/625

Screeningul purtătorilor a fost aplicat cu succes pentru *boala Tay-Sachs* (boală lizozomală letală) la populaţiile de evrei Ashkenazi din America de Nord şi pentru *β-*

[16] Proporţia de 5% rezultate fals pozitive este determinată mai ales de tirozinemii tranzitorii reversibile sau, mai rar, de alte cauze de hiperfenilalaninemie; această proporţie poate fi redusă prin retestare la 2-4 săptămâni sau folosind metodele fluorometrice ori, mai recent, spectrometria de masă (care măsoară concomitent şi tirozina).

talasemie în Cipru ducând, în două decenii, la o reducere de peste 90% a numărului de nou-născuţi cu aceste boli. În contrast, tentativele de screening a *sicklemiei* în comunităţile de afro-americani din SUA au fost mai puţin eficiente subliniind importanţa consultării, cooperării şi educării populaţiei ţintă. *Fibroza chistică* este o altă afecţiune autosomal recesivă pentru care screeningul purtătorilor este posibil (cu ajutorul PCR se pot identifica 12 dintre cele mai frecvente mutaţii, prezente la circa 90% dintre heterozigoţi) dar relaţia cost-beneficiu nu este, pentru moment, favorabilă. În aceste condiţii screeningul este limitat numai la indivizii cu istoric familial pozitiv şi se practică mai ales la femeile gravide sau la cele ce îşi planifică o sarcină (în cazul unui test pozitiv se evaluează şi partenerul de viaţă iar dacă ambii sunt heterozigoţi se recurge la diagnosticul prenatal al fetusului).

Screeningul purtătorilor are mai puţine beneficii pentru indivizii cu teste pozitive, iar dacă acţiunile educaţionale nu sunt suficient de ample şi eficiente, poate duce la stigmatizarea lor printr-o imagine negativă despre ei înşişi şi familia lor sau grupul etnic specific căruia îi aparţin. In plus, nerespectarea confidenţialităţii poate duce la probleme de integrare socio-profesională sau de asigurare medicală.

5. SCREENINGUL FAMILIAL

Screeningul genetic poate fi aplicat la membrii unei familii în care există o boală genetică sau o predispoziţie genetică (tabelul 18.1) datorită căreia unii indivizi sănătoşi, în special rudele de gradul I, au un risc crescut de a moşteni şi transmite anomalia genetică. Depistarea precoce a acestei anomalii la persoanele cu risc crescut poate contribui la prevenirea bolii sau a complicaţiilor ei, precum şi la luarea unei decizii reproductive informate. Practic, screeningul familial se aplică în următoarele situaţii:

- unele boli autosomal dominante pleiotrope, cu expresivitate variabilă sau penetranţă redusă, care se manifestă clinic în a treia sau a patra decadă de viaţă (boala polichistică renală AD, hipercolesterolemia familială, polipoza adenomatoasă familială, boala Huntington ş.a) sau mai precoce dar oligosimptomatic (neurofibromatoza, scleroza tuberoasă, sindromul Marfan ş.a); în multe din aceste cazuri este posibil un *diagnostic presimptomatic*;
- rudele sănătoase ale bolnavilor cu unele afecţiuni recesive autosomale (de exemplu, fibroza chistică) sau legate de X (de exemplu, distrofia musculară Duchenne) care au un risc crescut de a fi purtătoare ale genei mutante şi de a avea un descendent afectat dacă şi partenerul de cuplu se dovedeste a fi heterozigot (situaţie frecventă în anumite populaţii şi pentru anumite boli); în aceste cazuri testarea genetică a partenerului de cuplu şi/sau a produsului de concepţie (diagnostic prenatal) permite alegerea celor mai bune opţiuni pentru familie;
- în unele boli provocate de expansiunea repetiţiilor trinucelotidice (vezi capitolulele 6.B.1.4 şi 11.D), în special sindromul X fragil, se pot identifica printre rudele sănătoase ale bolnavilor persoanele cu *premutaţie,* cărora li se poate acorda un sfat genetic corect;
- în multe dintre bolile comune ale adultului, inclusiv diferite forme de cancer, se pot determina persoanele sănătoase cu *predispoziţie genetică* la boală; în epoca medicinii genomice, se prefigurează dezvoltarea screeningului populaţional pe direcţia *medicinii predictive* şi *identificării indivizilor susceptibili,* vulnerabili, la anumite boli comune;
- rudele apropiate ale purtătorilor sănătoşi de anomalii cromosomice echilibrate pot moşteni anomalia şi pot avea descendenţi anormali, cu monosomii sau trisomii parţiale (vezi capitolului 10).

Aceste situaţii variate pot fi abordate în Centrele de Genetică Medicală pe baza unui **registru genetic** al indivizilor şi familiilor afectate.

5.1. DIAGNOSTICUL PRESIMPTOMATIC.

În unele boli monogenice cu debut clinic tardiv sau cu penetranţă redusă se poate stabili dacă o persoană sănătoasă dar cu risc (de exemplu, o rudă de gradul I a unui bolnav cu o afecţiune autosomal dominantă) a moştenit sau nu gena mutantă, înainte ca semnele sau simptomele bolii să devine manifeste.

Diagnosticul presimptomatic se poate face în unele boli prin evaluare imagistică – RMN, CT, ecografie – (de exemplu, ADPKD, scleroza tuberoasă ş.a) sau prin alte investigaţii speciale (EMG, examene oftalmologice, ş.a), alteori prin studii biochimice (de exemplu, hipercolesterolemia familială, hemocromatoza) şi, cel mai frecvent şi mai sigur, prin analiza ADN (de exemplu, boala Huntington, distrofia miotonică, neurofibromatoza etc). De subliniat că rezultatele normale la explorările paraclinice şi biochimice *nu exclud diagnosticul bolii* dar reduc considerabil probabilitatea ca persoanele respective să fi moştenit gena mutantă. Numai analiza ADN permite de cele mai multe ori un diagnostic de certitudine.

Decizia testării genetice a persoanelor cu risc crescut va aparţine *numai* celor direct implicaţi; în cazul copiilor este preferabilă amânarea investigaţiilor până după 18 ani dacă stabilirea unui diagnostic precoce nu oferă beneficii medicale. Oricum, decizia nu este simplă deoarece un diagnostic pozitiv schimbă radical viaţa pacientului. Din păcate, în unele afecţiuni nu există un tratament eficace şi acest lucru influenţează decisiv luarea deciziei. Astfel, în boala Huntington – după ce testarea genetică a devenit disponibilă – numai 20-25% din persoanele cu risc au optat pentru testare. O situaţie asemănătoare se întâlneşte în cancerele de sân sau de colon ereditare în care, la persoanele cu teste pozitive, evaluările periodice (mamografie sau colonoscopie) pot detecta precoce o tumoră, cu şanse mari de a beneficia de o terapie adecvată, dar nu o pot preveni; nici eventuala îndepărtare chirurgicală a organului (de exemplu, mastectomie) nu elimină complet riscul de cancer. În alte afecţiuni (de exemplu, ADPKD sau hemocromatoză) diagnosticul precoce poate îmbunătăţi managementul pacientului, starea lui de sănătate şi poate, de asemenea, preveni eventualele complicaţii.

Există însă două beneficii indiscutabile:

- o persoană cu risc la care testele genetice se dovedesc negative are şansa evitării traumelor psihice determinate de incertitudinea privind apariţia bolii, precum şi a altor proceduri de diagnostic, de cele mai multe ori dificile şi/sau scumpe;
- o persoană la care diagnosticul genetic confirmă prezenţa mutaţiei poate lua o decizie reproductivă informată, evitând transmiterea mutaţiei la copiii săi.

Cert este că oricărei persoane cu risc crescut căreia i se oferă alternativa diagnosticului presimptomatic trebuie să i se asigure atât informaţii detaliate şi clare, cât şi o susţinere psihologică importantă. La acestea se adaugă confidenţialitatea deciziei şi rezultatelor.

5.2. REGISTRELE GENETICE

Cele mai multe servicii de genetică medicală înregistrează persoanele cu anumite afecţiuni şi datele lor familiale, deci şi rudele sănătoase cu risc genetic, într-o bază de date denumită *registru genetic*. Bolile ce vor fi incluse în registrele genetice trebuie să fie frecvente, cu consecinţe potenţiele severe, dar care să poată fi prevenite sau tratat, şi care să gemereze riscuri de recurenţă importante la alţi membri ai familiei (tabelul 18.5). Includerea unor persoane şi familii în registre trebuie să fie voluntară şi să asigure confidenţialitatea datelor, care nu pot fi folosite fără consimţământul participanţilor.

Tabelul 18.5 Boli ce pot fi incluse în registrele genetice

Boala genetică	Localizarea cromozomică
Boli autosomal dominate	
Boala polichistică renală AD	16,4
Boala Huntington	4
Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar	2,3
Cancerul de sân ereditar	13,17
Distrofia miotonică	19
Hipercolesterolemia familială	19
Neoplazia endocrină multiplă	10,11
Neuropatia senzorială şi motorie ereditară de tip I	1,5,8
Neurofibromatoza I şi II	
Polipoza de colon	17,22
Retinoblastomul	5
Sindromul Marfan	13
Scleroza tuberoasă	15
Sindromul Von Hippel-Lindau	9,16
Boli autosomal recesive	
Hemocromatoza ereditară	6
Fibroza chistică	7
Talassemia	11,16
Sicklemia	11
Boli legate de X	
Distrofia musculară Duchenne/ Becker	
Sindromul X fragil	
Hemofilia	
Retinita pigmentară	
Anomalii cromosomice echilibrate	
Translocaţii şi inversii	

Funcţiile profilactice ale unui registru genetic sunt:

- asigurarea unei legături permanente, bilaterale şi de durată între unitatea de genetică medicală şi familie, pentru a permite nu numai coordonarea unui management corect şi performant al bolnavilor şi rudelor cu risc, ci şi asigurarea unui suport psihologic adecvat;
- determinarea stării de purtător (în bolile recesive) sau realizarea unui diagnostic presimptomatic (în bolile dominante cu debut tardiv) şi prenatal atunci când acestea sunt solicitate;
- asigurarea implementării unor noi tehnologii şi tratamente odată ce acestea devin disponibile.

Practic, un registru genetic funcţional poate contribui decisiv la ameliorarea calităţii vieţii indivizilor şi familiilor cu risc de boli genetice severe precum şi la prevenirea lor.

C. DIAGNOSTICUL PRENATAL

În anul 1966, Steele şi Berg au arătat că se poate determina constituţia cromosomică a fătului prin cultura şi analiza celulelor obţinute din lichidul amniotic. Această metodă a deschis calea diagnosticului prenatal (DPN) la gravidele care, datorită vârstei reproductive avansate, aveau un risc crescut de a naşte un copil cu sindrom Down. Ulterior, o dată cu perfecţionarea ecografiei şi a testelor genetice, indicaţiile DPN s-au diversificat iar *cuplurile cu risc genetic sau malformativ crescut* au dobândit o valoroasă opţiune reproductivă[17].

[17] Până la introducerea DPN cuplurile cu risc genetic crescut aveau doar posibilitatea asumării riscului sau evitării oricărei sarcini (prin contracepţie sau sterilizare voluntară).

Ele vor putea concepe o sarcină ştiind că prezenţa sau absenţa bolii la fetus poate fi confirmată prin testare. În peste 95% din cazuri DPN este normal şi, ca urmare, marea majoritate a cuplurilor /gravidelor cu risc vor primi un sprijin psihologic decisiv. În prezenţa unei anomalii fetale cuplul parental va decide evoluţia ulterioară a sarcinii, în funcţie de tipul şi gravitatea defectului, precum şi a posibilităţilor reale de corecţie prenatală sau neonatală.

Diagnosticul prenatal este un act medical complex, înalt informativ, care permite depistarea a numeroase anomalii congenitale şi boli genetice în cursul vieţii fetale. Acest serviciu este realizat corect numai printr-o strânsă colaborare multidisciplinară, în care medicul genetician are un rol esenţial în evaluare, diagnostic şi sfat genetic.

Pentru a evidenţia poziţia „cheie" a medicului genetician în cadrul echipei de DPN (alcătuită din obstetricieni, ultrasonografişti, biochimişti, citogeneticieni ş.a) vom remarca faptul că DPN începe şi, în cazul unui făt anormal, se sfârşeşte cu *sfatul genetic.*

- Problema esenţială este *identificarea precoce a cuplurilor cu risc* genetic sau malformativ. Această acţiune ar trebui realizată *preconcepţional* deoarece ar permite un sfat genetic corect şi ar creşte opţiunile cuplului; în plus ar permite aplicarea biopsiei de vilozităţi coriale şi rezolvarea dilemei unui fetus normal sau anormal în primul trimestru de sarcină. Dacă soluţia optimă a unui sfat genetic preconceţional nu se poate realiz, atunci ar fi bine ca identificarea sarcinilor cu risc să se facă *precoce în cursul graviditătii,* prin screening ultrasonografic („semne de alarmă") sau seric matern (triplu test pozitiv). Din păcate multe gravide cu risc nu sunt identificate sau nu sunt trimise pentru DPN până la mijlocul trimestrului II, când această acţiune poate fi prea tardivă sau imposibilă.
- Cuplurile/gravidele propuse pentru DPN au nevoie de *informaţii* care să le permită să înţeleagă corect riscul lor genetic şi să accepte sau nu procedura. *Sfatul genetic* al candidatelor pentru DPN trebuie să precizeze:
  - riscul ca fătul să fie afectat;
  - natura şi consecinţele probabile ale afecţiunii;
  - procedurile posibile pentru DPN, cu riscurile şi limitelele lor;
  - intervalul de timp necesar pentru a obţine un rezultat;
  - posibilitatea unui rezultat dificil de interpretat;
  - necesitatea repetării procedurii în cazul unui eşec şi/sau efectuării de noi teste.
- Medicul genetician este cel mai abilitat să interpreteze rezultatele testelor citogenetice şi moleculare efectuate pe celulele fetale sau testele biochimice realizate în lichidul amniotic
- Identificarea unui făt anormal implică „continuarea" acţiunii de sfat genetic pentru a defini mai precis natura bolii, riscul de recurenţă şi opţiunile viitoare posibile.

Vom mai preciza că numeroase boli genetice nu pot fi încă diagnosticate prenatal (dar în fiecare an noi afecţiuni se adaugă pe lista celor la care DPN este posibil) precum şi faptul că DPN ridică probleme etice, uneori complexe şi emoţionale[18] (vezi capitolul 20)

1. INDICAŢIILE DIAGNOSTICULUI PRENATAL

Selecţia femeilor gravide pentru efectuarea DPN se bazează pe principiul că riscul unei anomalii fetale trebuie să fie cel puţin egal cu riscul de inducere a avortului prin utilizarea procedurii de DPN. În prezent, peste 200 de afecţiuni genetice pot fi diagnosticate prin DPN (vezi web site-ul *Genetest*) dar indicaţiile majore sunt următoarele:

(1) Vârsta reproductivă avansată a părinţilor

- *Femeile de peste 35 de ani* reprezintă indicaţia majoră de DPN deoarece acestea au riscul naşterii unor copii cu aneuploidii (în special trisomie 21; vezi tabelul 18.1) egal sau mai mare decât riscul de avort după amniocenteză.
- *Bărbaţii de peste 55 de ani* (după 50 de ani în celulele stem seminale se acumulează un număr mare de mutaţii dominante).

Tabelul 18.1. Incidenţa sindromului Down la nou-născuţi vii şi fetuşi în funcţie de vârsta maternă

	Incidenţă		
Vârsta maternă	La naştere	La amnio-	La BVC

[18] Întreruperea cursului sarcinii, mai ales pentru un defect mediu sau „tratabil" postnatal, este o dureroasă dilemă personală, care se poate rezuma prin: *„to kill or not to kill !"*

(ani)		centeză	
15-19	1/1250	—	—
20-24	1/1400	—	—
25-29	1/1100	—	—
30-34	1/900-1/500	—	—
35	1/385	1/250	1/250
36	1/300	1/200	1/175
37	1/225	1/150	1/175
38	1/175	1/115	1/115
39	1/140	1/90	1/90
40	1/100	1/70	1/70
41	1/80	1/50	1/50
42	1/65	1/40	1/30
43	1/50	1/30	1/25
44	1/40	1/25	1/25
≥45	1/25	1/20	1/15

Surse: Gardner şi Southerland (1996); Hsu (1998); Nussbaum et al (2001)

(2) Screeningul serului matern pozitiv şi/sau semne ecografice „de alarmă”.

(3) Prezenţa unei anomalii cromosomice structurale la unul dintre părinţi.

Riscul unei anomalii cromosomice la copil depinde de tipul anomaliei parentale şi sexul părintelui purtător (vezi capitolul 9.C.3.2).

(4) Existenţa unui copil cu o anomalie cromosomică de novo.

Studii recente au semnalat faptul că după naşterea unui copil cu sindrom Down, printr-un mecanism necunoscut (posibil un mozaicism parental), riscul naşterii unui alt copil cu o anomalie cromosomică este mai mare decât cel corespunzător vârstei materne (de exemplu, pentru o femeie de 30 de ani riscul unei anomalii cromosomice la făt este de 1/100, în comparaţie cu 1/390 riscul corespunzător vârstei).

(5) Istoric familial de boală monogenică (AR, AD sau LX) care poate fi diagnosticată la fetus prin analize biochimice sau ADN (tabelul 18.2.).

În această categorie sunt incluşi şi părinţii depistaţi ca fiind purtători sănătoşi prin programe speciale de screening efectuate în anumite grupuri de populaţie în care există o frecvenţă înaltă a unor mutaţii recesive. Pentru bolile recesive legate de X se va stabili mai întâi dacă fetusul este de sex masculin şi apoi se va recurge la DPN sau la diagnostic preimplantatoriu.

Tabelul 18.2. Boli monogenice mai frecvente la care este posibil un DPN prin analiza ADN

Boli monogenice	Nr. OMIM
Autozomal dominante	
Acondroplazia	100800
ADPKD	173900
Sindromul Marfan	154700
Neurofibromatoza tip 1	162200
Distrofie miotonică	160900
Boala Huntington	143100
Autozomal recesive	
Anemia falciformă	141900
Fenilcetonuria	261600
Boala Gaucher (I, II, III)	230800
Fibroza chistică	219700
Hiperplazia congenitală de suprarenală	201910
Ataxia Friedreich	229300
Atrofia musculară spinală	253300
Talasemiile α şi β	141800, 141900
Boala Tay-Sachs	272800
Legate de cromozomul X	
Hemofilia A	306700
Sindrom X fragil	309550

Distrofia musculară Duchenne	310200
Deficienţa de ornitin transcarbamilază	311250
Adrenoleucodistrofia	300100

(6) Istoric familial sugestiv pentru o boală legată de X pentru care nu există un test specific de DPN.

În acest caz determinarea sexului fetal poate fi utilă pentru a ajuta părinţii cu risc să decidă continuarea sau terminarea sarcinii.

(7) Riscul unui defect de tub neural.

Rudele de gradul I ale pacienţilor cu DTN vor fi supuse DPN deoarece au un risc crescut de a avea un copil cu DTN.

(8) Rude de gradul I cu o malformaţie unică (în special malformaţie de cord) sau un sindrom plurimalformativ (posibil mendelian)

(9) Agresiuni teratogene în cursul sarcinii.

Expunerea gravidelor la teratogeni cunoscuţi (vezi capitolul 14.B.2.1); afecţiuni materne (diabet zaharat, epilepsie tratată cu anticonvulsivante, fenilcetonurie).

(10) Istoricul obstetrical pozitiv

În cazul unor avorturi spontane recurente şi/sau nou-născuţi morţi, deşi există deseori un risc mic de recurenţă, se poate recurge la DPN pentru a evita o nouă sarcină anormală.

2. TEHNICILE DE DIAGNOSTIC PRENATAL

Spre deosebire de metode de screning prenatal, neinvazive şi fără risc fetal, aplicate la un număr mare de gravide, pentru a identifica sarcinile cu risc crescut de a fi anormale, tehnicile de diagnostic prenatal sunt de regulă invazive (biopsia vilozităţilor coriale – BVC – , amniocenteza, cordocenteza); ele presupun prelevarea şi analiza celulelor fetale pentru a stabili – la gravidele selecţionate pe baza riscului genetic şi/sau malformativ crescut – dacă fătul este sau nu normal. La aceste metode, folosite curent în Centrele de DPN, se adaugă o serie de *tehnici speciale* (de exemplu, diagnosticul preimplantatoriu) sau, încă, experimentale (de exemplu, selecţia şi analiza celulelor fetale din circulaţia maternă) – folosite în puţine Centre profilate.

Indiferent de procedură, tehnicile de DPN trebuie să îndeplinească următoarele condiţii de aplicabilitate:

- *securitatea,* care depinde de experienţa celui ce aplică procedura; securitatea este exprimată prin rata avorturilor imediate sau tardive, consecutive aplicării procedurii;
- *acurateţea,* exprimată prin calitatea rezultatelor
- *controlul de calitate* ce se realizează prin utilizarea de proceduri standardizate, care vizează calificarea personalului, funcţionarea echipamentelor şi mai ales respectarea tehnologiilor şi acurateţea rezultatelor.

Testele trebuie efectuate cât mai *precoce*, iar rezultatele se impun a fi obţinute *rapid* pentru ca, în cazul în care gravida este purtătoarea unui fetus anormal, aceasta să poată beneficia de avortul selectiv, pe cât posibil *în termenul stabilit prin lege*. Desigur, tehnicile de DPN sunt relativ scumpe dar beneficiile pentru reproducerea şi sănătatea familiilor sunt mari.

Tabelul 18.3. Tehnici de diagnostic prenatal

Tehnici de DPN	**Timpul optim** (în săptămâni)	**Afecţiuni diagnosticate**

Tehnici standard		
a) Ecografia fetală	10-18	- Anomalii congenitale. Displazii scheletice.
b) Tehnici de diagnostic (invazive)		
▪ BVC	10-12	- Anomalii cromosomice
▪ Amniocenteza	15-18	
- lichid		- DTN (determinarea AFP)
- celule		- Anomalii cromosomice; unele boli metabolice (prin analize enzimatice); unele boli moleculare (prin analiza ADN).
▪ Cordocenteza	20-40	- Anomalii cromosomice, boli hematologice sau imunologice, boli moleculare
Tehnici speciale:		
▪ Amniocenteza precoce	12-14	- Defecte de tub neural. Anomalii cromosomice
▪ Analiza celulelor fetale din sângele matern	>20	- Anomalii cromosomice; unele boli moleculare (prin analiza ADN).
▪ Diagnosticul genetic preimplantatoriu	2	- Trisomiile frecvente; unele boli moleculare diagnosticate prin analiza ADN (PCR).
▪ Fetoscopia	17-20	- Genodermatoze

2.1. ECOGRAFIA FETALĂ

Ecografia este cea mai folosită metodă de vizualizare a fătului (depăşind net rediografia sau RMN) deoarece este fără riscuri pentru mamă şi făt. A fost utilizată ca metodă de diagnostic prenatal încă din 1972, scopul iniţial fiind cel al detectării anencefaliei. Capacitatea informativă a investigaţiilor ecografice a crescut spectaculos în ultimii ani, o dată cu sporirea performanţelor aparaturii şi cu formarea experţilor în medicina fetală.

Informaţiile obstetricale oferite de ecografie depind de trimestrul în care este efectuată examinarea.

- În trimestrul I (de obicei la 10±2 săptămâni de amenoree), examenul ecografic stabileşte: vârsta sarcinii şi determină viabilitatea.
- În trimestrul II (de obicei la 18±2 săptămâni), ecografia permite diagnosticul gemelarităţii, determinarea poziţiei placentei, vârsta gestaţională – prin măsurarea diametrului biparietal şi lungimea femurului, screeningul anomaliilor structurale fetale.
- În trimestrul III (de obicei la 32-34 săptămâni), investigaţiile ecografice permit, determinarea dimensiunilor şi poziţionării fetusului, aprecierea ratei creşterii, intensitatea mişcărilor fetale, sexul, anomaliile lichidului amniotic, screeningul anomaliilor.

În prezent, în numeroase ţări, ecografia se efectuează de rutină la toate femeile gravide pentru evaluarea morfologiei şi creşterii fătului. Metodei ecografice i se descriu două niveluri.

Primul nivel serveşte ca procedură de rutină pentru stabilirea viabilităţii şi crşterii fetale, precum şi pentru screeningul anomaliilor fetale (sunt vizualizate doar anomaliile grosiere şi se pot evidenţia doar anumite „semne ecografice de alarmă"); cuplurile (şi unii medici) trebuie să înţeleagă *limitele acestui nivel de evaluare*, determinate de rezoluţia şi focusarea limitată a aparaturii, la care se adaugă timpul redus de investigaţie (şi uneori lipsa de experienţă a examinatorului în medicină fetală !); sunt posibile rezultate fals pozitive (de exemplu, chiştii intracranieni) sau fals negative (nevizualizarea multor anomalii congenitale). În scopul evitării erorilor de interpretare, suspiciunea existenţei unei anomalii fetale trebuie confirmată de un ecografist expert.

Ecografia fetală detaliată (nivelul II) este o expertiză de fineţe efectuată de specialişti în medicina fetală şi practicată cu aparatură performantă (cu focusare pe un anumit organ[19], ecocardiografie cu Doppler[20], imagini tridimensionale) atunci când există riscul apariţiei unor anomalii specifice. Perioada optimă pentru efectuarea examenului ecografic este situată între 16-18 săptămâni de sarcină. Sensibilitatea metodei pentru determinarea malformaţiilor

[19] De exemplu, măsurarea dimensiunilor ventriculilor cerebrali fetali.

[20] Analiza Doppler apreciază amploarea fluxului sanguin în vasele ombilicale şi poate defini patologia cardiacă fetală; fluxul redus cu rezistenţă crescută este frecvent notat în întârzierile creşterii fetale.

congenitale majore este de 40-60% dar pentru anumite tipuri de anomalii este mult mai mare (aproape 100% pentru anencefalie; 85-90% pentru spina bifida); specificitatea metodei este de aproape 99%.

Defectele fetale ce pot fi detectate în al doilea trimestru al sarcinii sunt:

- *anomalii ale sistemului nervos*: anencefalie, chist al fosei posterioare, encefalocel, displazia facială, holoprozencefalia (anomalii ale ventriculilor cerebrali şi ale feţii), hidrocefalia, microcefalia, mielomeningocel, porencefalia (leziuni chistice ale creierului), rachischisis, spina bifida;
- *defecte cardiovasculare*: aritmii, colecţii lichidiene pericardice, defecte septale, situs inversus, defecte valvulare, anomalii vasculare, hiperplazie sau hipoplazie ventriculară;
- *anomalii toracice*: atrezia esofagiană, hernia diafragmatică, efuziuni pleurale, chisturi intratoracice;
- *malformaţii gastrointestinale*: absenţa muşchilor abdominali, ascita, limfangiom chistic, atrezie intestinală, laparoschisis (extruzia para-ombilicală a viscerelor abdominale), chisturi mezenterice, omfalocel (herniere ombilicală a viscerelor abdominale);
- *malformaţii urogenitale*: hidronefroză, hidroureter, rinichi polichistici, atrezie renală, teratoame, valvă uretrală;
- *malformaţii musculo-scheletale*: artrogripoză, displazie osoasă, picior strâmb, fracturi, paralizia membrelor, reducţia membrelor, defecte ale mineralizării;
- *alte anomalii*: bride amniotice, gemeni siamezi, teratoame, tumori.

Vizualizarea unor anomalii fetale multiple se impune a fi urmată de amniocenteză şi de analiza citogenetică. Între 15% şi 30% dintre fetuşii la care se decelează ecografic anomalii morfologice prezintă aberaţii cromozomice. O serie de *semne ecografice de alarmă* se asociază cu un risc crescut de anomalii cromosomice. Astfel:

- îngroşarea pliului nucal identificată în trimestrul I de sarcină este sugestivă pentru sindromul Down;
- excesul de piele pe ceafă este sugestiv pentru sindromul Turner sau pentru sindromul Down;
- placenta mare sugerează prezenţa triploidiilor, a hidropsului fetal sau a talasemiei;
- întârzierea precoce a creşterii se produce în cazul trisomiilor şi a triploidiilor;
- despicăturile labio-palatine sunt observate frecvent la fetuşii cu trisomii sau triploidie;

Markeri ecografici sugestivi pentru prezenţa unei anomalii fetale:

- Calcificări abdominale (peritonită meconială);
- Degete permanent flexate (trisomia 18, artrogripoză);
- Defect conotrucal sau defect al trunchiului comun, manifestat ca tetralogie Fallot sau ca defect vascular (sindroamele DiGeorge şi velo-cardio-facial secundare unei deleţii – del22q11);
- Defecte ale osificării boltei craniene (anencefalie);
- Deformări toracice (displazie scheletică)
- Hipertrofia vezicii urinare (valvă uretrală);
- Hipodensitate osoasă (hipofosfatazie);
- Higroma chistică (sindrom Turner);
- Hipoplazia facială şi despicătură palatină (trisomia 13 - holoprozencefalie);
- Fracturi (osteogenesis imperfecta);
- Număr crescut de chisturi coroidale (trisomii);
- Polidactilie (trisomie 13, sindrom Ellis Van-Creveld);
- Pterygium colli (sindrom Turner);
- Semnul lămâii – craniu în formă de lămâie (spina bifida);
- Scurtarea oaselor lungi (displazie osoasă);
- Translucenţa nucală (trisomia 21);
- Volum crescut al ventriculilor cerebrali (hidrocefalie);

Vom încheia prezentarea ecografiei subliniind din nou necesitatea diferenţierii obiectivelor celor două niveluri de analiză, între care există o mare diferenţă, necesitatea utilizării unor *protocoale standardizate*, precum şi faptul că ecografia se constituie într-un auxiliar *necesar* al procedurilor invazive de recoltare a celulelor fetale (spre exemplu, în amniocenteză – poziţia fătului şi placentei va determina poziţia optimă de inserţie a acului seringii de prelevare a lichidului amniotic).

2.2. AMNIOCENTEZA.

Amniocenteza este procedura de a obtine o probă de lichid amniotic (LA) prin puncţie transbdominală, ghidată ecografic (figura 18.4). LA conţine celule de origine fetală[21] care pot fi supuse testelor ADN pentru detectarea mutaţiilor sau cultivate[22] pentru a efectua analiza cromosomilor (rezultatele se obţin, însă, după 2-4 săptămâni, ceea ce constituie un dezavantaj semnificativ); în LA pot fi realizate dozări biochimice, în special AFP şi acetilcolinesteraza care (împreună cu ecografia fetală) pot diagnostica 99% din cazurile de DTN deschise.

Amniocenteza „clasică" se practică (de bicei în ambulatoriu) la 15-17 săptămâni de gestaţie (după prima zi a UM); în unele centre se foloseşte şi amniocenteza „precoce", la 12-14 săptămâni de sarcină.

În ambele cazuri, amniocenteza este precedată de o examinare ecografică atentă pentru a stabili: numărul de fetuşi, conformaţia şi viabilitatea fetală, vârsta gestaţională, poziţia placentei, volumul aproximativ al LA şi locul puncţiei (în funcţie de placentă şi făt). Apoi sub ghidaj ecografic se introduce transabdominal (cu o mişcare lentă dar continuă) un ac de puncţie rahidiană până în cavitatea amniotică. Primii ml de LA (contaminaţi cu celule materne) se lasă să se scurgă şi apoi cu o altă seringă se aspiră circa 20 ml LA (câţiva ml în cazul amniocentezei precoce[23]). Proporţia reuşitelor este de peste 99%. În 1-2% de cazuri se poate produce o uşoară contaminare cu sânge matern. După amniocenteză se observă ecografic bătăile cordului fetal şi se urmăreşte starea gravidei (scurgeri vaginale de LA sau sânge, contracţii, febră).

Complicaţia majoră a amniocentezei este riscul de 0,5-1% de inducere a avortului, peste riscul bazal de 2-3% pentru *orice* sarcină în trimestrul II. Alte complicaţii rare sunt: scurgerile mici de LA, infecţiile şi lezarea fătului. Amniocenteza precoce are o rată de avort semnificativ mai mare decât cea clasică, comparabilă cu BVC (~2,5%); la aceasta se adaugă şi riscul de detresă respiratorie a noului-născut sau deformări ortopedice benigne.

2.3 BIOPSIA VILOZITĂŢILOR CORIALE.

Biopsia vilozităţilor coriale (BVC)[24] este metoda de obţinere a unor fragmente de vilozităţi coriale (figura 18.5), structuri de origine embrionară ce derivă din trofoblast, partea externă a blastocistului (vezi figura 14.1). Probele obţinute conţin atât celule fetale cât şi celule din decidua maternă, care trebuie îndepărtate cu grijă înainte de analiză. Celulele trofobalstice pot fi utilizate pentru efectuarea unor teste ADN pentru detectarea mutaţiilor şi analizei cromosomice directe (datorită activităţii mitotice înalte a acestor celule) sau după cultivare.

BVC se efectuează la 10-12 săptămâni de gestaţie[25], pe cale transcervicală (cu ajutoul unui cateter flexibil) sau transabdominal (cu un ac subţire de puncţie rahidiană), sub ghidaj ecografic, în funcţie de localizarea placentei. Efectuarea BVC în această perioadă precoce de sarcină permite obţinerea mai rapidă a unor rezultate, reducând perioada de incertitudine şi stresul psihologic al aşteptării lor până la mijlocul trimestrului II, precum în cazul amniocentezei; în plus, dacă se optează pentru întreruperea sarcinii, aceasta se poate face la sfârşitul trimestrului I, prin metode mai facile. Dezavantajul diagnostic al metodei este că nu permite evaluarea AFP

Complicaţiile BVC sunt reprezentate de sângerări (40%), avort (1-2% în plus faţă de nivelul bazal de 2-5% pentru perioada gestaţională de 7-12 săptămâni), producerea unor malformaţii ale membrelor (anomalii transverse) şi feţei când este practicvată înaintea săptămânii a 10-a de sarcină[26].

2.4. CORDOCENTEZA

---

[21] Celulele fetale provin din descuamaţiile pielii sau mucoaselor tractului urinar sau digestiv.
[22] Eşecurile culturii de celule amniotice sunt de circa 0,8-1%, în condiţiile unei tehnici perfecte.
[23] În acest caz procesarea LA presupune o tehnicitate remarcabilă.
[24] În limba engleză CVS – de la *chorionic villus sampling*.
[25] Poate fi efectuată şi intr-un stadiu mai tardiv de sarcină dar în acest caz se numeşte biopsie placentară
[26] Mecanismele teratogenice posibile ar fi producerea unor embolii în circulaţia fetală sau hipoperfuzia (determinată de hemoragie feto-maternă sau spasme vasculare consecutive eliberării unor substanţe presoare)

Cordocenteza[27] este procedura prin care se obţine o probă de 2-3 ml sânge fetal puncţionând, sub ghidaj ecografic, rădăcina cordonului ombilical (proporţia reuşitelor sub 95%) (figura 18.6). Se practică de obicei la 18-21 săptămâni de sarcină la paciente care se prezintă târziu pentru DPN, atunci când culturile de celule amniotice nu reuşesc sau dau rezultate ambigue (mozaicism) sau atunci când diagnosticul ADN nu este posibil pentru o boală ce poate fi identificată prin teste biochimice ale plasmei ori ale celulelor sanguine (unele afecţiuni hematologice sau imunologice ereditare, infecţii bacteriene, virale sau parazitare). Sângele fetal necesită numai câteva zile de cultură pentru obţinerea unor preparate cromosomice de foarte bună calitate. Riscul de avort datorită procedurii este 2-3%.

2.5. FETOSCOPIA

Fetoscopia comportă introducerea in uter pe cale transabdominală a unui instrument subţire, flexibil, denumit fetoscop, care permite vizualizarea embrionului sau a fetusului şi colectarea de ţesuturi ale produsului de concepţie (piele, muşchi, ţesut hepatic). Fetoscopia detectează defecte şi boli fetale ce nu pot fi sesizate prin celelalte tehnici invazive (genodermatoze, distrofii musculare, boli hepatice). Fetoscopia se practică după 20 săptămâni de sarcină şi numai în scop experimental, în câteva centre specializate.

2.6. DIAGNOSTICUL GENETIC PREIMPLANTATORIU

Diagnosticul genetic preimplantatoriu (DGP) a fost introdus în 1990 (Handsyside et al) ca o alternativă la diagnosticul prenatal, pentru cuplurile cu risc crescut de a transmite o boală ereditară la descendenţii lor. În principiu, embrionii sunt produşi prin tehnici de fertilizare *in vitro* (IVF) şi în stadiul de clivare pot fi obţinute, prin biopsie embrionară, 1-2 blastomere, care sunt analizate genetic; apoi embrionii neafectaţi sunt transferaţi în uterul femeii, pregătită pentru sarcină.

Procedurile de diagnostic trebuie să fie precise şi rapide pentru a permite transferul embrionului în aceeaşi zi cu efectuarea biopsiei[28]; în funcţie de indicaţia diagnostică se folosesc curent două metode: amplificarea genică prin PCR - pentru diagnosticul mutaţiilor genice - şi analiza cromosomică prin FISH interfazic – pentru stabilirea sexului genetic al embrionului, screeningul aneuploidiilor pentru cromosomii 13,18,21, X şi Y sau caracterizarea cromosomică a embrionului cuplurilor care au o anomalie cromosomică echilibrată. În consecinţă numărul de boli diagnosticate este mic şi, uneori, se produc erori de diagnostic.

Indicaţiile actuale ale diagnosticului genetic preimplantatoriu sunt următoarele:

(1) Selecţia sexului[29] *la embrionii cu mutaţii ale cromosomului X.* (Determinarea sexului genetic prin FISH, folosind sonde pentru cromosomii sexuali).

(2) Diagnosticul unor boli monogenice (identificarea mutaţiilor prin PCR).

(3) Purtătorii de anomalii cromosomice echilibrate[30] – au un risc crescut de a avea descendenţi cu monosomii sau trisomii parţiale (vezi capitolul 9.C.3.2).

În aceste cazuri se folosesc: a) FISH – dar numai atunci când sunt disponibile sonde pentru analiza segregării meiotice a unei translocaţii echilibrate; b)studiul cromosomilor după conversie interfazică (nucleul interfazic al blastomerului este convertit în nucleu metafazic după fuziunea sa cu un ovocit enucleat)[31]; c) hibridizare genomică comparativă, ce implică co-hibridizarea ADN extras din blastomer şi a unei probe ADN control cu cromosomii unei metafaze normale.Toate aceste tehnici sunt scumpe şi laborioase.

(4) Alte indicaţii: femei cu vârsta de peste 35 de ani, cupluri cu avorturi repetate, suspiciunea unui mozaicism gonadal.

---

[27] În limba engleză PUBS- de la *percutaneous umbilical blood sampling*

[28] Pentru proceduri mai laborioase, embrionul se cultivă până la stadiul de blastocist.

[29] Tehnicile actuale pentru caracterizarea mutaţiilor de pe cromosomul X sunt prea lungi pentru a fi aplicate la DGP.

[30] Dacă femeia este purtătoare a anomaliei este posibil un diagnostic indirect (PCGD – preconception genetic diagnosis) prin analiza cromosomilor primului globul polar, înainte de fertilizarea ovocitului.

[31] In acest caz se folosesc: SKY (*spectral karyotyping*) sau FISH multicolor – prin care fiecare cromosom este colorat diferit.

Cu toate progresele tehnice realizate în ultimii ani, DGP are numeroase limite tehnice şi ridică unele probleme etice. Trecând peste dificultăţile de a obţine embrioni prin IVF, problema cea mai mare cu care se confruntă DGP este faptul că numai *una sau două celule sunt disponibile* pentru analiză; în aceste condiţii şi *în timpul scurt* de care se dispune pentru studiu se pot produce erori de diagnostic. Una dintre sursele acestor erori este *mozaicismul cromosomic,* frecvent la embrionii în stadiul preimplantatoriu; în aceste condiţii nucleul unui blastomer nu poate fi reprezentativ pentru restul embrionului. Deşi aceste erori sunt rare, diagnosticul prenatal este recomandat ulterior în toate cazurile; de aceea, în prezent, se consideră că DGP nu este încă o alternativă fericită la diagnosticul prenatal, ci mai curând o cale mai bună de a asigura cuplurile cu risc crescut că vor avea un copil normal şi sănătos şi/sau de a evita un avort recurent sau o întrerupere a cursului sarcinii (pentru un fetus anormal).

2.7. ANALIZA CELULELOR FETALE DIN SÂNGELE MATERN.

Este cunoscut faptul că la femeile gravide, una din 10^8 –10^9 celule nucleate circulante îşi are originea în organismul fetusului. Celulele fetale care circulă în sângele matern sunt de trei tipuri: limfocite, eritroblaşti şi celule ale sinciţiotrofoblasului. Acestea pot fi identificate şi izolate din sângele matern datorită diferenţelor antigenice dintre mamă şi fetus. Din cele trei tipuri celulare prezente în sângele gravidei, eritroblaştii par a fi cei mai adecvaţi pentru depistarea prenatală. Potrivit unor date recente, numărul celulelor fetale din sângele matern este mai mare în cazul sarcinilor cu fetuşi prezentând aneuploidii şi, în special, al celor cu trisomie 21, ceea ce ar facilita detecţia unor astfel de anomalii.

Reuşita izolării şi asigurarea acurateţei rezultatelor comportă parcurgerea a trei etape:

- identificarea celulelor fetale cu ajutorul anticorpilor monoclonali sensibili şi înalt specifici,
- utilizarea unei tehnici de îmbogăţire (triajul prin citometrie în flux a celulelor marcate fluorescent),
- analiza genetică a celulelor astfel obţinute, utilizându-se tehnici de înaltă sensibilitate (PCR, FISH). FISH cu sonde specifice anumitor cromozomi, face posibilă stabilirea sexului fetusului (coeficientul de exactitate este cuprins – la primigeste - între 94% şi 100% în cazul sarcinilor care au depăşit 8 săptămâni, precum şi detectarea diferitelor anomalii numerice.

Înainte de aplicarea pe scară largă a metodei se impun a fi rezolvate o serie de probleme care ar putea altera rezultatele determinărilor. Dintre acestea pot fi menţionate contaminarea, dificil de evitat, cu celule materne şi artefactele cauzate de posibilele efecte ale incompatibilităţii ABO şi Rh asupra supravieţuirii în circulaţia maternă a globulelor roşii ale fetusului. Acestor inconveniente li se adaugă şi faptul că limfocitele feţilor anteriori pot persista în circulaţia maternă timp de câţiva ani, genomul lor putând fi confundat cu cel al celulelor actualului produs de concepţie.

Pentru moment, analiza celulelor fetale din sângele periferic matern este o metodă care operează la interfaţa dintre activitatea de cercetare şi cea a prestării de servicii medicale. Este, totuşi, de aşteptat ca, într-un viitor nu prea îndepărtat, această tehnologie să-şi dobândească statutul de cea mai fiabilă metodă de evaluare noninvazivă a calităţii produsului de concepţie.

3. ANALIZE DE LABORATOR EFECTUATE PE CELULE FETALE

3.1. ANALIZA CROMOSOMILOR

Diagnosticul anomaliilor cromosomice la făt reprezintă cea mai frecventă componentă a DPN fiind indicat în prezenţa unei anomalii cromosomice structurale la unul dintre părinţi sau dacă în familie există un copil cu o anomalie cromosomică de novo precum şi la gravidele peste 35 de ani, cu triplu test pozitiv sau semne ecografice de alarmă. Testarea citogenetică prenatală nu este recomandată în următoarele situaţii: boli monogenice, istoric familial de defecte de tub neural, iradieri terapeutice materne sau paterne anterioare concepţiei, anxietate

parentală, informarea cu privire la sexul fetusului (dacă nu există istoric de boli recesive legate de cromozomul X).

Se realizează de obicei prin analiza celulelor fetale (obţinute prin BVC sau amniocenteză), cultivate timp de 1-2 săptămâni. Mult mai rar, cromosomii se pot cerceta pe preparate obţinute prin culturi (3 zile) de sânge fetal obţinut prin cordocenteză. Strategia analizei prenatale a cromosomilor ar fi următoarea :

- în cazul unei indicaţii stabilite preconcepţional se va recurge la BVC (analiză directă sau prin cultură), pentru a rezolva rapid problema ;

  Celulele vilozităţilor coriale au index mitotic înalt şi este posibilă obţinerea rapidă, fără cultură, a unor preparate; calitatea cromosomilor obţinuţi prin metode directe este însă nesatisfăcătoare (cromosomi contractaţi) şi permite numai detectarea anomaliilor numerice şi a celor structurale mari (rezoluţia marcajului cromosomic este inadecvată pentru analize detaliate). În plus circa 2% din probe pot da rezultate ambigue datorită mozaicismului cromozomic şi în aceste cazuri este recomandată amniocenteza pentru a stabili dacă fătul are anomalii cromozomice. Recent s-au dezvoltat tehnicile de FISH pe nuclei interfazici pentru identificarea aneuploidiilor frecvente, ale cromosomilor 13,18,21, X şi Y.
- dacă cultura de vilozităţi coriale nu creşte sau rezultatul este incert, datorită mozaicismului cromosomic (vom reveni), sau indicaţia analizei este pusă mai tardiv - există încă timp pentru a analiza cromosomii prin amniocenteză;
- în cazurile rare în care cultura de amniocoite nu creşte sau rezultaul este incert se va recurge la cordocenteză.

Analiza cromosomică prenatală se mai poate confrunta cu două situaţii dificile: mozaicurile cromosomice şi cromsomii markeri sau derivativi

Mozaicismul cromozomial. Această condiţie este rar întâlnită în citogenetica prenatală, fiind observată, în medie, la 5% dintre fetuşii analizaţi în al doilea trimestru de sarcină, şi numai la 1 din 3500 născuţi vii.

Termenul de mozaic defineşte prezenţa într-un organism sau ţesut a două sau mai multe linii celulare genetic distincte, derivate dintr-un singur zigot. Se descriu patru tipuri de mozaicuri:

- *mozaicismul adevărat* – detectat în colonii multiple dim mai multe culturi primare diferite; studiile postnatale confirmă prezenţa sa la nou-născut; majoritatea mozaicurilor adevărate implică gonozomii, cromozomii mici: 18, 20, 21, 22 sau un cromozom marker;
- *mozaicismul monocelular* – sau mozaic de nivelul I (o celulă cu un extracromozom sau o anomalie structurală prezentă într-o singură colonie sau într-un singur flacon de cultură) ; are o incidenţa de circa 3% şi poate fi considerat un artefact ;
- *pseudomozaicismul* - sau mozaic de nivelul II (două sau mai multe celule cu aceeaşi anomalie prezente într-o singură colonie sau flacon de cultură); reprezintă 0,5% din toate mozaicurile ; pseudomozaicismele cele mai frecvente interesează cromozomii 2, 3, 7, 18.
- *mozaicism limitat la placentă* (« *confined placental mosaicism* »); incidenţă: 1-2% din sarcinile viabile. O placentă cu cariotip anormal poate determina moartea fetusului, deşi cariotipul fetal este normal; invers, o placentă cu cariotip normal poate permite supravieţuirea mai îndelungată a unui fetus cu anomalii cromozomiale[32].

Cele mai multe mozaicuri detectate în celulele trofoblastului sunt cauzate de generarea unui extracromozom în cursul cultivării *in vitro* (pseudomozaicism) sau de contaminarea cu celule materne (mozaicism cu linii XX şi XY) datorită asocierii intime între celulele materne şi celulele vilozităţilor coriale. Diferenţierea de mozaicismul adevărat este posibilă prin recursul la tehnici capabile să stabilească dacă toate celulele dintr-o colonie sunt descendente ale unei singure celule fetale.

Confirmarea şi interpretarea mozaicismului reprezintă una dintre cele mai dificile probleme legate de DPN. *Confirmarea* mozaicismului se poate face numai prin analiza celulelor sângelui fetal obţinut prin cordocenteză, deşi o ecografie normală (fără tulburări de creştere şi anomalii congenitale) este de bun augur.

[32] Cariotipul normal în placentă se poate produce prin pierderea cromosomului suplimentar prezent la făt

Semnificaţia clinică a mozaicismului. În mod obişnuit, mozaicismul diagnosticat prenatal nu se asociază cu anomalii fetale. 60% din mozaicurile ce interesează gonozomii au fenotip normal. Este totuşi recunoscută relaţia mozaicismului placentar atât cu retardul creşterii intrauterine, cât şi cu rata crescută a avorturilor. Pseudomozaicismele pot fi considerate artefacte ale culturilor pe termen lung. În schimb prezenţa unei linii cu trisomie autozomală în care sunt implicaţi cromozomii 8, 9, 13, 18, 21 sau, foarte rar, iso(12p)(sindromul Pallister-Killian) reclamă efectuarea unor investigaţii extensive deoarece în fenotipurile nou-născuţilor vii figurează, de regulă, anomalii morfologice şi clinice.

Cromosomi markeri sau derivativi. Ocazional, într-un cariotip normal ca număr se pot observa cromosomi markeri sau o rearanjare cromozomică rară. Semnificaţia acestor date la fetus nu poate fi determinată fără analiza cromosomilor la ambii părinţi. Dacă aceleaşi modificări sunt găsite la un părinte normal atunci ele pot fi considerate variante normale; rearanjările de novo neechilibrate pot cauza anomalii fetale.

3.2 DETERMINĂRI BIOCHIMICE PENTRU BOLI METABOLICE

Peste 100 de boli metabolice pot fi diagnosticate prenatal prin studii biochimice efectuate pe celule fetale sau lichid amniotic. Cele mai multe (fiind autosomal recesive) au un risc mare de recurenţă şi aceasta ajustifică DPN. Raritatea lor este însă un impediment tehnic pentru centrele obişnuite şi de aceea este bine ca gravidele cu risc să fie trimise în centre specializate.

3.3. ANALIZA ADN

Numeroase afecţiuni monogenice (vezi tabelul 18.2) pot fi diagnosticate prin analiza ADN, folosind metode de detectare directă a mutaţiilor sau diagnosticul indirect, prin studiul unor markeri strâns înlănţuiţi cu gena mutantă. Exceptând bolile comune – fibroza chistică, sindromul X fragil – analiza prenatală a ADN se face de obicei în laboratoare specializate şi, cel mai bine, cunoscând mutaţia patogenică caracteristică unei familii.

4. AVANTAJELE DPN

În majoritatea ţărilor din Europa, o dată cu dezvoltarea planificării familiale a crescut interesul pentru calitatea produsului de concepţie şi asistenţa prenatală şi perinatală s-au ameliorat considerabil ; în acest context screeningul şi DPN au devenit unele dintre cele mai solicitate servicii medicale. Astfel, cuplurile cu risc genetic sau malformativ crescut au dobândit o valoroasă opţiune reproductivă: ele vor putea concepe o sarcină ştiind că prezenţa sau absenţa bolii la fetus poate fi confirmată prin testare. În peste 95% din cazuri rezultatele DPN sunt normale şi, ca urmare, marea majoritate a cuplurilor /gravidelor cu risc vor fi asigurate că viitorul lor copil va fi sănătos, fapt care constituie principalul avantaj al DPN. Într-o mică proporţie de cazuri, fetusul va fi serios afectat şi, în absenţa unei terapii prenatale efective, cuplurile vor alege soluţia întreruperii sarcinii. Acest lucru va produce, la nivelul populaţiei, un declin al incidenţei bolilor genetice severe. DPN este încă o metodă scumpă de diagnostic dar beneficiile sale pentru familie şi populaţie, ambele interesate în naşterea de copii sănătoşi, realizează o relaţie cost-beneficiu pozitivă. Cu certitudine screeningul şi DPN se vor dezvolta în viitor şi vor deveni una dintre cele mai eficace metode de profilaxie ale bolilor genetice.

5. PROBLEME ETICE

scurtă prezentare cu trimiter la caoitolul 20

INTERNET

1. Academiei Americane de Pediatrie - pagina de web cu informaţii legate de metodele de screening http://www.medicalhomeinfo.org/resources/screening.html -
2. Comitetul consultativ pentru testare genetic[(SUA) http://www4.od.nih.gov/oba/sacgt.htm
3. GeneTests/Geneclinics home page - Seatle:University of Washington : http://www.geneclinics.org/
4. Informaţii despre tehnicile de diagnostic prenatal şi indicaţiile lor http://omni.ac.uk/browse/mesh/detail/C0033053L0033053.html#1
5. Metode de diagnostic prenatal http://medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/PRENATAL/PRENATAL.html
6. Metode de screening prenatal http://www.geneticstesting.com/prenatal_genetic_screening/
7. Site-ul oficial al GeneTest dedicat testării genetice http://www.genetests.org

Bibliografie specifică selectivă

1. Aitken DA, Crossley JA, Spencer K. Prenatal screeining for neural tube defects and aneuploidy. Principles and Practice of Medical Genetics. Ed. DL Remoin, JM Connor, RE Pyeritz, BR Korf, Fourth Edition, Churchill Livingstone, London, Edinbourgh, 2002, pp 763-401
2. Burke W, Coughlin SS et al – *Application of population screening principles to genetic screening for adult-onset conditions* – Genet Test 2001;5:201-211
3. Burke W - *Genetic testing* – N Engl J Med 2002;347:1867-1875
4. Chodirker BN, Cadrin G, Davies GA et al. Canadian Guidelines for Prenatal Diagnosis. J Obstet Gynaecol Can, 23:616-624, 2001
5. Clague A, Thomas A. – *Neonatal biochemical screening for disease* – Clin. Chim. Acta 2002;315:99-110
6. Egozcue J, Santalo J, Gimenez C, Perez N, Vidal F – *Primplantation genetic diagnosis* – Molec. Cel.Endocrinology 2000;77:21-25
7. Elias S, Simpson JL, Shulman LP. Techniques for prenatal diagnosis 805-825
8. Elias S – *Preimplantation genetic diagnosis by comparative genomic hybrridization* – N Engl J Med 2001;345:1569-1571
9. Goel V - *Appraising organized screening programmes for testing for genetic susceptibility to cancer* – BMJ 2001;322:1174-1178
10. Guttmacher AE, Collins FS –*Population screening in the age of genomic medicine* – Engl J Med 2003;348:50-58
11. Harper JC, Delhanty DA. – *Preimplantation genetic diagnosis* – Current Opin Obst Gynec. 2000;12:67-72.
12. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. - *Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice* / J Med Genet 2002;39:6-11
13. Wald NJ – *The definition of screening* – J Med Screen 2001;8:1-2
14. * * * - *Newborn screening task Force. Serving the family from birth to the medical home: newborn screening / ablueprint for the future* – Pediatrics 2000;106:389-442

PRINCIPII DE GENETICA MEDICALA

Cuprins

CAPITOLUL 1 - GENETICA UMANĂ ŞI IMPORTANŢA EI ÎN MEDICINA MODERNĂ

Mircea Covic

A. Conţinutul geneticii umane.
   1. Genetica – ştiinţa eredităţii şi variabilităţii
   2. Genetica umană - disciplină fundamentală, clinică şi medico-socială.

B. Omul, ereditatea şi mediul.
   1. Individualitatea genetică şi biologică.
   2. Determinismul caracterelor fenotipice.
   3. Relatia Genotip → Fenotip ← Mediu.
   4. Omul - subiect de studiu al geneticii umane

C. Istoria geneticii umane
   1. Etapa preştiinţifică (→ 1865).
   2. Etapa fundamentării geneticii ca stiinţă şi introducerii sale în medicină (1865→ 1960) .
   3. Dezvoltarea geneticii medicale (1960→ 1970).
   4. Noua genetică umană şi medicină moleculară (1980 →)

D. Importanţa geneticii în medicina modernă
   1. Bolile genetice
   2. Genetica medicală
   3. Medicina în era post-genomică
   4. Abordarea genetică în relaţia medic – pacient

CAPITOLUL 2 - STRUCTURA ŞI ORGANIZAREA CELULARĂ A ADN

Mircea Covic, Ionel Sandovici, Trandafir Angheloni

A. ADN - substratul molecular al eredităţii **MC**
   1. Evoluţia conceptiilor despre natura genei.
   2. Demonstrarea rolului genetic al ADN.

B. Structura ADN **MC**
   1. Structura primară şi secundară a ADN.
   2. Polimorfismul structural şi flexibilitatea moleculei de ADN

C. Structura genomului uman **MC+IS**
   1. Date generale.
   2. Genomul nuclear
   3. Genomul mitocondrial.
   4. Schiţa secvenţei genomului uman

D. Organizarea ADN în celulă **MC+AT**
   1. Aparatul genetic
   2. Cromatina
   3. Cromosomii umani

CAPITOLUL 3 - STRUCTURA, ANALIZA ŞI LOCALIZAREA GENELOR

Mircea Covic, Dragoş Ştefănescu

A. Concepţia clasică despre structura genei **MC**
   1.Gena - unitate de structură a materialului genetic
   2. Fenomenele de înlănţuire genică (linkage) şi încrucişare cromosomică (crossing-over)

B. Concepţia actuală despre structura genei **MC**
   1. Anatomia unei gene care codifică o proteină
   2. Gene comune şi gene specifice.
   3. Gene unice şi familii de gene.
   4. Elementele genetice mobile

C. Metode de clonare şi analiză a genelor (tehnologia ADN recombinant) **MC+DS**
   1. Clonarea ADN în celule.
   2. Clonarea acelulară a ADN (metoda PCR)
   3. Metode de analiză a acizilor nucleici.
   4. Metode de analiză a proteinelor
   5. Tehnicile de modificare a materialului genetic.

D. Localizarea genelor pe cromosomi (harta genică la om) **MC**
   1. Cartografierea genetică
   2. Cartografierea fizică
   3. Aplicaţiile cartografierii genomului uman
   4. Proiectul genom uman

CAPITOLUL 4 - EXPRESIA INFORMAŢIEI EREDITARE (FUNCŢIA GENEI)

Mircea Covic, Ionel Sandovici

A. Concepţia clasică despre funcţia genei **MC**
   1. Gena unitate de funcţie şi mutaţie.
   2. Poligenia
   3. Pleiotropia
   4. Interacţiunile GENEI
   5. Heterogenitatea genetică

B. Concepţia actuală despre funcţia genei **MC**
   1. Genele controlează sinteza proteinelor
   2. Structura proteinelor
   3. Genele structurale determină secvenţa aminoacizilor în proteină
   4. Relaţia "o genă → un polipeptid" este mult mai complexă
   5. Interacţiunile genice în concepţia actuală

C. Mecanismele moleculare ale expresiei genice **MC**
   1. Transcripţia
   2. Translaţia
   3. Localizarea proteinelor
   4. Modificările post-translaţionale ale proteinelor.
   5. Sinteza proteinelor , originea şi evoluţia vieţii.

D. Reglarea expresiei genelor. **IS+MC**
   1. Reglarea pretranscriptională (epigenetică) a expresieie genice
   2. Reglarea transcripţională.
   3. Reglarea posttranscripţională.
   4. Reglarea translaţională.

CAPITOLUL 5 - TRANSMITEREA INFORMAŢIEI EREDITARE

Mircea Covic, Marius Bembea, Victor Pop, Mihai Voloşciuc

A. Replicarea ADN. **MC**
   1. Proteinele implicate în replicarea ADN
   2. Mecanismul molecular al replicării ADN.
   3. Particularităţile replicării ADN la eucariote.

B. Transmiterea informaţiei genetice de la o celulă la celulele „fiice” **VP+MC**
   1. Ciclul celular.
   2. Mitoza

C. Transmit erea informaţiei genetice de la părinţi la descendenţi **MC**
   1. Gametogeneza
   2. Fecundarea

D. Ereditatea monogenică **MC+MV**
   1. Legile lui Mendel.
   2. Transmiterea caracterelor monogenice
   3. Ereditatea monogenică non - mendeliană

E. Ereditatea poligenică şi multifactorială **MB+MC**
   1. Stabilirea naturii genetice a unui caracter familial non-mendelian
   2. Teoriile care explică determinismul genetic al caracterelor multifactoriale
   3. Identificarea genelor implicate în bolile multifactoriale.

CAPITOLUL 6 - VARIABILITATEA GENETICĂ

Mircea Covic, Iuliana Dimofte, Julieta Puiu, Ionel Sandovici

A. Sursele de variabilitate **MC**
   1. Mutaţiile
   2. Recombinările genetice
   3. Migraţiile

B. Mutaţiile genice **MC+IS**
   1. Tipuri şi mecanisme de producere ale mutaţiilor genice
   2. Consecinţele genotipice şi fenotipice ale mutaţiilor genice
   3. Cauzele şi frecvenţa mutaţiilor genice
   4. Mecanismele reparării leziunilor ADN.

C. Anomaliile cromosomice **MC+ID**
   1.Tipurile şi mecanismele de producere ale anomaliilor cromosomice.
   2. Consecinţele fenotipice ale anomaliilor cromosomice
   3. Consecinţele anomaliilor cromosomice neechilibrate
   4. Frecvenţa şi cauzele anomaliilor cromosomice

D. Polimorfismele genetice **JP+MC**
   1.Polimorfisme proteice
   2. Polimorfisme ADN

CAPITOLUL 7 - GENETICA POPULAŢIILOR

Julieta Puiu, Emilia Severin, Mircea Covic

A. Frecvenţa genelor şi genotipurilor într-o populaţie **JP+MC**
1. Definiţia şi obiectivele geneticii populaţiilor
2. Legea Hardy-Weinberg
3. Aplicaţiile medicale ale legii Hardy-Weinberg

B. Factori care influenţează frecvenţa genică şi genotipică **MC+JP**
1. Uniunile (încrucişările) neîntâmplătoare
2. Mutaţiile
3. Selecţia
4. Populaţiile reduse
5. Migraţiile şi fluxul genic
6. Efectele acţiunilor disgenice şi eugenice asupra frecvenţelor genice

C. Originea şi evoluţia populaţiilor umane **ES+MC**
1. Dovezile paleoantroplogiei.
2. Dovezile genetice ale evoluţiei
3. "Rasele" umane

CAPITOLUL 8 - ROLUL FACTORILOR GENETICI ÎN PRODUCEREA BOLILOR

Mircea Covic, Ortansa Stoica, Ionel Sandovici, Vlad Gorduza

A. Interacţiunea dintre ereditate şi mediu în producerea bolilor **MC**
1. Starea de sănătate şi boală
2. Concepţii despre boală

B. Ecogenetica şi farmacogenetica **OS+IS+VG**
1. Ecogenetica
2. Farmacogenetica

C. Bolile genetice **MC**
1. Clasificarea bolilor genetice
2. Caracterele generale ale bolilor genetice.
3. Impactul şi consecinţele bolilor genetice asupra stării de sănătate

D. Abordarea genetică în medicină **MC**

CAPITOLUL 9 - CONSULTUL ŞI SFATUL GENETIC

Mircea Covic, Marius Bembea, Ionel Sandovici, Dragoş Ştefănescu,

A. Consultul genetic **MC**
1. Definiţie. Obiective.
2. Cadrul organizatoric
3. Indicaţiile consultului genetic
4. Principiile de bază ale consultului genetic
5. Etapele consultului genetic

B. Explorările genetice **MC+DS+IS**
1. Diagnosticul cromosomic
2. Diagnosticul molecular

C. Sfatul genetic **MB+MC**

D. Serviciile de genetică clinică **MC**

CAPITOLUL 10 - BOLILE CROMOSOMICE

Mircea Covic, Iuliana Dimofte, Vlad Gorduza

A. Boli cromosomice autosomale. **MC+ID**
1. Trisomiile autosomale
2. Sindroamele cu deleţii autosomale
3. Sindroamele cu microdeleţii şi microduplicaţii cromosomice

B. Sindroamele cu anomalii ale cromosomilor sexuali **ID+MC**
1. Sindromul Turner
2. Sindromul Klinefelter
3. Trisomia X şi alte polisomii X
4. Sndromul 47,XYY

C. Tulburările de reproducere de cauză cromosomică **MC+VG**
1. Sterilitatea feminină
2. Sterilitatea masculină
3. Avorturi spontane ş nou-născuţii morţi.

CAPITOLUL 11 - BOLILE MONOGENICE

Ionel Sandovici, Paula Grigorescu-Sido, Victor Pop, Dragoş Ştefănescu

A. Bazele moleculare şi biochimice ale bolilor monogenice. **MC+VP**
1. Mutaţii cu pierderea funcţiei.
2. Mutaţii cu câştig de funcţie
3. Mutaţii cu dobândirea unei funcţii noi
4. Mutaţii asociate cu expresia heterocronică sau ectopică

B. Boli moleculare **PGS+IS+MC**
1. Boli enzimatice (erori inascute de metabolism)
2. Boli produse prin anomalii ale proteinelor de transport.
3. Boli prin anomalii ale proteinelor structurale
4. Boli prin anomalii ale proteinelor implicate în comunicarea intercelulară şi controlul dezvoltării.
5. Boli ale proteinelor implicate în controlul homeostaziei extracelulare.

D. Boli genetice produse prin mutaţii dinamice **MC+DS**
1. Caractere generale
2. Boală Huntington
3. Distrofia miotonică

CAPITOLUL 12 - BOLILE MITOCONDRIALE

Dragoş Ştefănescu

A. Structura moleculară, biogeneza şi funcţiile mitocondriilor
1. Genomul mitocondrial
2. Biogeneza şi funcţiile mitocondriilor
3. Mutaţiile ADNmt
4.Transmiterea la descendenţi a mutaţiilor ADNmt.

B. Principalele tipuri de boli mitocondriale
1. Manifestările clinice ale afecţiunilor mitocondriale
2. Tratamentul bolilor mitocondriale

C. Mutaţiile ADNmt şi senescenţa
D. Mutaţiile ADNmt în bolile degenerative
E. Mutaţiile mitocondriale şi tumorigeneza

CAPITOLUL 13 - BOLILE MULTIFACTORIALE

Marius Bembea, Adrian Covic, Mircea Covic

A.Bolile comune ale adultului **AC+MB+MC**
1. Boala coronariană.
2. Hipertensiunea arterială
3. Diabetul zaharat
4. Astmul bronşic
5. Bolile neurodegenerative: boala Alzheimer şi boala Parkinson
5. Psihozele
6. Cancerul
7. Obezitatea
8. Alcoolismul

B. Malformaţiile Congenitale Multifactoriale **MB+MC**
1. Defectele de tub neural
2. Hidrocefalia
3. Malformaţiile congenitale de cord
4. Despicăturile labiale şi despicăturile palatine
5. Alte anomalii congenitale izolate

C. Retardul mental **MC**

CAPITOLUL 14 - GENETICA DEZVOLTĂRII ŞI ANOMALIILE CONGENITALE

Ionel Sandovici, Mircea Covic, Dragoş Ştefănescu, Andra Hurjui

A. Genetica dezvoltării **IS+DS+AH**
1. Categorii de gene implicate în controlul dezvoltării
2. Procese majore în cadrul dezvoltării embrionare
3. Rolul apoptozei în dezvoltare
4. Senescenţa

B. Anomaliile Congenitale **MC**
1. Clasificarea anomaliilor congenitale.
2. Cauzele anomaliilor congenitale.
3. Conduita practică în diagnosticul anomaliilor congenitale

4. Profilaxia anomaliilor congenitale

C. Sexualizarea normală şi patologică **IS+MC**
1. Embriologia aparatului genital
2. Controlul genetic şi hormonal al sexualizării
3. Tulburări ale dezvoltării sexuale
4. Conduita practică în tulburările de sexualizare

CAPITOLUL 15 - RETARDUL MENTAL

Mircea Covic, Cristina Rusu

A. Date generale: definiţie, clasificare, prevalenţă
B. Etiologia retardului mental
1. Cauzele genetice şi negenetice ale retardului mental
2. Retardul mental legat de X (RMLX)
C. Evaluarea diagnostică a retardului mental
1. Anamneza şi evaluarea clinică
2. Teste de diagnostic
D. Sfatul genetic în retardul mental.

CAPITOLUL 16 - GENETICA SISTEMULUI IMUN

Petre Cianga, Mircea Covic

A. Generalităţi despre sistemul imun
B. Mecanismele genetice care stau la baza generării diversităţii imunoglobulinelor
1. Formarea lanţurilor uşoare
2. Formarea lanţurilor grele
3. Mecanismul rearanjărilor genelor care codifică regiunea variabilă
4. Factori care contribuie la generarea diversităţii imunoglobulinelor
5. Asocierea genei constante şi comutarea de clasă
C. Mecanismele genetice care stau la baza generării diversităţii TCR
D. Complexul major de histocompatibilitate
1. Genele MHC
2. Proprietăţile şi funcţiile sistemului HLA
3. Sistemul HLA şi asocierea cu diverse afecţiuni
E. Imunodeficienţele.

CAPITOLUL 17 - GENETICA BOLII CANCEROASE

Ionel Sandovici, Dragoş Ştefănescu, Mircea Covic

A. Clase de gene implicate în dezvoltarea cancerului
1. Oncogenele
2. Genele supresoare de tumori
B. Anomalii citogenetice in cancer
1. Anomalii cromozomice numerice
2. Anomalii cromozomice structurale
3. Amplificările genice
C. Evoluţia multistadială a cancerelor
1. Imortalizarea celulelor tumorale
2. Modificări epigenetice în cancer
3. Mutaţii ale ADN mitocondrial
4. Angiogeneza tumorală
5. Invazia şi metastazarea
6. Modele de evoluţie multistadială a cancerelor
D. Predispoziţia genetică în cancer
1. Cancerele ereditare
2. Cancerele familiale
3. Cancere cu predispoziţie genetică fără istoric familial
E. Noi perspective în diagnosticul şi tratamentul cancerelor

CAPITOLUL 18 - PROFILAXIA BOLILOR GENETICE

Dragoş Ştefănescu, Mircea Covic

A. Principalele direcţii de profilaxie a bolilor genetice
B. Screeningul populaţional al bolilor genetice
1. Principii de screening populaţional
2. Screeningul prenatal
3. Screeningul neonatal

4. Screeningul populaţional al heterozigoţilor
5. Screeningul familial. Diagnosticul presimptomatic.Registrele genetice

C. Diagnosticul prenatal
1. Indicaţiile diagnosticului prenatal
2. Tehnicile de diagnostic prenatal
3. Analize de laborator efectuate pe celule fetale
4. Avantajele DPN
5. Probleme etice

CAPITOLUL 19 - TRATAMENTUL BOLILOR GENETICE

Ortansa Stoica, Ionel Sandovici, Mircea Covic, Georgiana Tauşer

A. Strategii de terapie ale bolilor genetice
1. Metode de tratament care acţionează la nivelul fenotipului
2. Tratamentul tulburărilor metabolice sau biochimice asociate bolilor genetice
3. Metode de tratament care acţionează la nivelul proteinei deficitare
4. Metode de tratament bazate pe modularea farmacologica a expresiei genice
5. Terapia celulară

B. Terapia genică
1. Terapia genică somatică
2. Terapia genica germinala
3. Boli ereditare candidate pentru terapia genică
4. Terapia genică pentru bolile neereditare
5. Consideraţii etice privind terapia genică

CAPITOLUL 20 - PROBLEME ŞI DILEME ETICE ÎN GENETICA MEDICALĂ

Vasile Astărăstoae, Cristina Gavrilovici, Ortansa Stoica, Mircea Covic

A. Principiile generale ale bioeticii
1. Respectarea autonomiei
2. Nonvătămarea şi beneficiul persoanei
3. Respectarea confidenţialităţii şi protejarea intimităţii
4. Dreptate şi echitate
5. Dileme şi conflicte etice.
6. Datoriile medicilor confruntaţi cu boli genetice

B. Probleme etice specifice unor activităţi de genetică medicală
1. Sfatul genetic
2. Testarea genetică
3. Screeningul populaţional şi familial
4. Terapia genică

C. Reflexii bioetice asupra omului şi umanităţii

Glosar
Index